

**A humorális immunválasz szabályozása:
a GL7 epitóp természete és differenciált
expressziója és az ösztrogén immunmoduláló
hatása**

Doktori értekezés

Készítette: Ádori Mónika

Témavezetők:

Dr. László Glória

Prof. Sármay Gabriella

Biológia Doktori Iskola

Immunológia doktori program

Programvezető:

Prof. Erdei Anna

tanszékvezető egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék
Budapest, 2010.

Tartalomjegyzék

A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
BEVEZETÉS	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
1.1. A humorális immunválasz	6
1.1.1. T-dependens és T-independens antigének.....	6
1.1.2. A limfociták migrációja a másodlagos nyirokszervekbe.....	7
1.1.3. A germinális centrumok kialakulása	8
1.1.4. A B-sejtek antigéntől-függő fejlődési folyamata.– A GC reakció	9
1.1.5. Újabb germinális centrum modellek	13
1.2. Amit a GL7 epitópról tudunk.....	14
1.3. Szíalsavak és szíalsavkötő lektinek (sziglekek)	16
1.4. Az ösztrogén hatásai a szervezet fiziológiai folyamataira.....	20
1.4.1. Az ösztrogén genomiális és nem-genomiális hatásainak rövid áttekintése ...	23
1.4.2. Genomiális hatások	23
1.4.3. Gyors, nem-genomiális hatások	24
2. CÉLKITŰZÉSEK	27
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
3.1. Sejtek és sejtvonalak.....	29
3.2. Oldatok, pufferek	30
3.3. Reagensok, ellenanyagok	31
3.4. Módszerek	33
3.4.1. Egér, illetve patkány lépsejtek izolálása, T- és B-sejt szeparálás.....	33
3.4.2. Humán sejtek izolálása	34
3.4.3. Sejtaktiválás.....	35
3.4.4. Sejtfelszíni molekulák expressziójának vizsgálata áramlási citometriával ..	35
3.4.5. A szénhidrát oldallánc vizsgálata: a sejtek enzimatisz kezelésé	35
3.4.6. Az scFv konstrukció készítése.....	36
3.4.7. Az egyláncú ellenanyag kimutatása SDS-PAGE és western blot módszerrel	40
3.4.8. Az egyláncú ellenanyag kötődésének vizsgálata áramlási citometriával	40
3.4.9. A kísérletek során használt egerek műtéte és immunizálása	40
3.4.10. ELISA.....	41

3.4.11. ELISPOT	42
3.4.12. Egér IFN γ ELISA	42
3.4.13. Az ösztrogén fehérjefoszforilációra gyakorolt hatásának vizsgálata: sejtstimulálás, sejtlízis, SDS-PAGE és western blot	43
3.4.14. NF κ B aktiváció mérése	44
3.4.15. NF κ B transzlokáció vizsgálata konfokális mikroszkópiával	44
3.4.16. Statisztikai módszerek	45
4. EREDMÉNYEK	46
4.1. A GL7 epitóp szerkezete és differenciált expressziója	46
4.1.1. A GL7 epitóp expressziója humán és egér mieloid és limfoid sejtvonalakon	46
4.1.2. A GL7 ellenanyag egy szialidáz érzékeny epitópot ismer fel	48
4.1.3. A GL7 epitóp <i>in vitro</i> aktivációt követően patkány lépsejteken is kimutatható	51
4.1.4. A GL7 emberi perifériás limfocitákon konstitutív módon kifejeződik	52
4.1.5. Aktiváció hatására humán T- és B-limfocitákon eltérően változik a GL7 expresszió	53
4.1.6. A GL7 epitópot felismerő egyláncú ellenanyag létrehozása	55
4.2. Az ösztrogén immunmoduláló hatása.....	60
4.2.1. Ovariectomia hatása a TD és a TI-2 immunválaszra	60
4.2.2. Ösztrogén visszapótlás hatása az ovariectomizált egerek ellenanyagtermelésére	63
4.2.3. Az ösztrogén gyors, nem-genomiális hatásai B- és T-sejteken: Akt és ERK foszforiláció.....	64
4.2.4. Az ösztrogén NF κ B aktivációt indukál B- és T-limfocitákban.....	67
4.2.5. Az ösztrogén IFN γ gén aktivációt indukál B- és T-limfocitákban	68
DISZKUSSZIÓ	69
FONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK	76
ÖSSZEFOGLALÁS	77
SUMMARY	78
IRODALOMJEGYZÉK	79
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	90
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	91

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

Ab	antibody (ellenanyag)
APC	antigen-presenting cell (antigén prezentáló sejt)
BCR	B cell receptor (B-sejt receptor)
BLC (BCA-1)	B lymphocyte chemoattractant (B cell attracting chemokine-1)
BLR-1	Burkitt's lymphoma receptor-1
bp	bázispár
BSA	bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)
CAM	Cell-adhesion molecule
CD	cluster of differentiation
CDR	Complementary-determining region (hipervariábilis régió)
CMAH	Citidin monofoszfát-N-acetilneuraminsav hidroxiláz
ConA	Concanavalin A
CR	Complement receptor (komplement receptor)
CTLA-4	Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4
DAP	DNAX-activating protein (DNAX-aktiváló fehérje)
DC	dendritic cell (dendritikus sejt)
DNP	di-nitrophenyl (di-nitrofenil)
ELC	Epstein-Barr virus induced receptor ligand chemokine
ER	Estrogen receptor
ERE/HRE	Estrogen responsive element/Hormone responsive element
ERK	Extracellular signal activated kinase
E2	17β-estradiol
FDC	follicular dendritic cell (follikuláris dendritikus sejt)
FBS	fetal bovine serum (magzati szarvasmarha szérum)
FCS	fetal calf serum (magzati borjú szérum)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FR	framework (vázszekvencia)
GC	germinal centre (csíráközpont)
GPR30	G-protein coupled receptor 30
HEPES	N-(hidroxietil) piperazin-N'-(2-etánszulfonsav)
HEV	high endothelial venule
HIGM	hiper IgM
HPA	hipotalamusz-hipofízis-adrenal cortex (mellékvese kéreg) tengely
HPG	hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely
HRP	horse radish peroxidase (torma-peroxidáz)
Hsp90	heat shock protein 90 (hő sokk-fehérje 90)
ICAM-1,2	Intercellular adhesion molecule-1,2
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus (inzulin-függő cukorbetegség)
IC	immune complex (immunkomplex)
iDC	interdigital dendritic cell (interdigitális dendritikus sejt)
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IPTG	izopropil β-D-1-thiogalaktopiranozid
ITAM	immunoreceptor tyrosine based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine based inhibition motif
KDN	keto-deaminoneuramininsav
KLH	keyhole limpet haemocyanin

LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LPS	lipopoliszacharid
MAA	Maackia amurensis agglutinin
MAdCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAG	Myelin-associated glycoprotein (mielin-asszociált glikoprotein)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mER	membrane Estrogen receptor
MF	macrophage (makrofág)
MHC	major histocompatibility gene complex
MNAR	Modulator of nongenomic activity of estrogen receptor
MS	multiple sclerosis (szklerózis multiplex)
Neu5Ac	N-acetilneuraminsav
Neu5Ge	N-glikolilneuraminsav
Ni-NTA	Nikkel-nitrilotriacetic acid (nikkel-nitrilo-triecetsav)
NOS	Nitrogén oxid szintáz
OD	optikai denzitás
PALS	periarteriolar lymphoid sheat (periarterioláris hüvely)
PBS	phosphate-buffered saline
OE-PCR	overlapextension-polimerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase (foszfoinozitid-3 kináz)
PKC	Protein kináz C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PNA	peanut agglutinin
PNAd	Peripheral lymphnode addressin
RA	rheumatoid arthritisz
RAG	recombinase activating gene (rekombináz aktiváló gének)
RT	reverz transzkripció
scFv	single-chain Fv (egyláncú ellenanyag fragmentum)
SDC	sodium deoxycholate
SDS-PAGE	sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis
SHP	SH2-domain-containing protein-tyrosine phosphatase
SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine
SLE	szisztémás lupusz erithematózus
SLS	sodium lauroyl sarcosine
SMP	Swann cell myelin protein
SNA	Sambucus nigra agglutinin
ST6Gal I	β -galaktozid- α 2-6-szialisiltranszferáz
SR	Steroid receptor
T	tesztoszteron
T _C	citotoxikus T-sejt
T _H	helper T-sejt
TCR	T cell receptor (T-sejt receptor)
TD	T-sejt dependens
TGF	Transforming growth factor (transzformáló növekedési faktor)
TI	T-sejt independens
TLR	Toll like receptor
TNF	tumor nekrosisz faktor
TNP	tri-nitrophenyl (tri-nitrofenil)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late activation antigen-4

BEVEZETÉS

Az immunrendszer sejtjeinek fejlődése és aktiválódása együtt jár a sejtfelszíni glikoproteinek, glikolipidek glikánláncainak – glikoziltranszferázok (pl. szialiltranszferáz, fukoziltranszferáz) és glikozidázok (pl. szialidázok/neuraminidázok) által történő – átrendeződésével, a glikoziláció változásával. A szialsavat tartalmazó GL7 epitóp jó példa erre, mivel az egér limfopoézis során az elsődleges nyirokszervekben a B- és T-sejt előalakokon megjelenik, az érett limfocitákról eltűnik és csak a sejtek aktivációját követően expresszálódik újra. A glikozilációnak szerepe van az immunsejtek működésében, így például a patogénfelismerésben, a természetes immunrendszer modulálásában, az immunsejtek homeosztázisának és a gyulladás folyamatának szabályozásában is. Rendellenes glikozilációs folyamatok autoimmun betegségek és rákos megbetegedések kialakulásához vezethetnek (Christie, Shaikh et al. 2008). Számos kutatási eredmény igazolja, hogy egyes szteroid hormonok (pl. kortizol; ösztadiol, tesztoszteron) befolyásolják glikoziltranszferázok expresszióját és aktivitását, ezáltal tumorok képződéséhez járulhatnak hozzá (Peyrat, Recchi et al. 2000; Medvedova and Farkas 2004).

A biológiai tudományok intenzíven kutatott területe az immunrendszer és a hormonrendszer közti kapcsolatok, valamint a neuro-immun kölcsönhatások feltárása. A stresszválasz szabályozásában résztvevő hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely és a védekezőrendszer kétirányú kapcsolatát számos tudományos munka tárgyalja. Ezzel szemben a fertilitás szabályozásáért felelős hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely és az immunrendszer kölcsönhatásáról ismereteink még eléggé hiányosak. Vannak adatok arról, hogy a nemi hormonok, így az ösztrogén is befolyásolják az immunrendszer működését, szerepük van a limfociták fejlődésében, továbbá közvetlenül befolyásolják az immunsejtek funkcióit is. Régóta ismert, hogy bizonyos autoimmun betegségek szignifikánsan nagyobb gyakorisággal fordulnak elő nőkben, mint férfiakban, ami a nemi hormonok (ösztrogén, tesztoszteron) immunmoduláló szerepére hívja fel a figyelmet. Általánosságban elmondható, hogy az ösztrogének immunstimuláló, az androgének immunszuppresszálo hatással rendelkeznek, különösen a humorális immunválasz tekintetében.

Mindezek tükrében a humorális immunválaszra gyakorolt ösztrogén hatás, és a limfociták aktiváció-függő glikoziláltságának a vizsgálata érdekes új eredményeket hozhat.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A humorális immunválasz

Az evolúció során a fertőző ágensek leküzdésére két egymásra épülő és egymással szerves összhangban működő immunrendszer fejlődött: a veleszületett (természetes), és a szerzett, antigénre specifikus (adaptív) immunrendszer. A természetes immunitás filogenetikailag ősbí, melynek elemei feltehetően minden többsejtű szervezetben megtalálhatók. Erre a rendszerre épül rá a kb. 400 millió évvel ezelőtt megjelenő adaptív immunrendszer, mely a porcos és a csontos halakban, a kétélűtűekben, a madarakban és az emlősökben alakult ki (Fearon and Locksley 1996). A természetes immunrendszer sejt és molekuláris elemei révén felismeri a szervezetbe bekerülő kórokozót, majd biztosítja az adaptív immunrendszer humorális, vagy celluláris folyamatainak elindítását. A humorális (B-sejt) immunválaszt az antigénnel kölcsönhatásba került, aktiválódott B-sejtek utódsejtjei, illetve az azokból differenciálódott plazmasejtek által termelt ellenanyagok közvetítik.

1.1.1. T-dependens és T-independens antigének

Az antigén típusa alapján a humorális immunválaszt T-dependens (T-sejtektől függő) (**TD**) és T-independens (T-sejtektől független) (**TI**) csoportokra oszthatjuk (Mond, Lees et al. 1995). A T-dependens antigének fehérje természetű molekulák, melyek csak T-sejtek segítségével képesek a lépben, illetve a nyirokcsomókban elhelyezkedő, konvencionális B2-sejteket aktiválni, míg a T-independens antigének e segítség nélkül is ellenanyagtermelést indukálnak a peritoneális és pleurális üregekben (has-, és mellkas-üregben) megtalálható B1-sejteket (Jeurissen, Ceuppens et al. 2004). A polimer szerkezetű T-independens antigéneket TI-1 és TI-2 típusba sorolhatjuk. A **TI-1**-es típusú antigének poliklonális aktivátorok (pl. LPS, CpG), melyek Toll-like receptorokon (TLR) keresztül stimulálják a B-sejteket. A poliszacharid természetű, **TI-2**-es antigének (pl. TNP-Ficoll, DNP-Ficoll) ismétlődő biokémiai struktúráik révén közvetlenül (a BCR keresztékítése révén) képesek antigénspecifikus immunválaszt kiváltani (Obukhanych and Nussenzweig 2006). Ez utóbbi csoportba sorolhatók a klinikai szempontból fontos baktériumokra (pl. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*) jellemző kapszula poliszacharidok (Rijkers and Mosier 1985). Mivel TI-2-es

típusú antigénekre specifikus ellenanyagok emberben csak a 2. életév után termelődnek, ezért a 2 év alatti korosztály e fertőzésekre sokkal érzékenyebb.

A TD és a TI-1 típusú antigénnel szemben, a TI-2-es antigénekre adott immunválasz általában kis affinitású, IgM izotípusú ellenanyagok termelődésével jár, az immunválasz során nem megy végbe izotípusváltás és affinitásérés, valamint elmarad a memóriasejtek képződése is (Rijkers, Sanders et al. 1998).

1.1.2. A limfociták migrációja a másodlagos nyirokszervekbe

A szervezetbe bekerülő testidegen anyagok (antigének) kiszűrését a másodlagos, vagy perifériás nyirokszervek (nyirokcsomók, lép, mandulák, Peyer-plakkok) végzik, ahová az antigének a bejutásuk helyéről dendritikus sejtek segítségével jutnak el. Az elsődleges nyirokszervekben lezajló, antigéntől független limfopoézist (Rolink and Melchers 1993) követően a véráram útján az érett, naív limfociták is a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, ahol a sejtféjlődés antigéntől függő szakasza zajlik (MacLennan, Liu et al. 1992). A limfociták érfalon keresztüli átjutása – az extravazáció – többlépéses folyamat, melynek korai szakaszát a szelektincsaládba tartozó adhéziós molekulák közvetítik. A szelektinek leukocitákon, illetve endotélsejteken expresszálandó, szénhidrátokat felismerő molekulák. A leukocitákon expresszálandó L-szelektin (CD62L) a nyirokcsomók magas endotélsejtekkel bélelt posztkapilláris venuláin (HEV) jelenlévő PNA_d (CD34) és GlyCAM-1, valamint a Peyer plakkok endotélsejtjein expresszálandó MAdCAM-1 adhéziós molekulákhoz kötődik. E laza sejtkapcsolatok segítségével a nyiroksejtek az erek endotélsejtjeihez „tapadva” azokon „végiggördülnek”. A szorosabb adhézióhoz kemokin-aktivált nagy affinitású integrin molekulák is szükségesek, melyek az immunglobulin szupercsaládba tartozó molekulákhoz kötődnek. Így pl. a limfociták $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, CD29), $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1) integrinjei az endotélsejtek MAdCAM-1, VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54) és ICAM-2 (CD102) molekuláit ismerik fel (Butcher and Picker 1996; Ebnet and Vestweber 1999). A legismertebb kemokin, mely ezt a folyamatot indukálja, a HEV sejtei által expresszált SLC (Cyster 1999). Végül a nyiroksejtek újabb adhéziós molekulák (pl. LFA-1, Mac-1) segítségével jutnak át az érfalon (diapedézis) (Butcher and Picker 1996).

A másodlagos nyirokszervek két nagyobb régióra oszthatók: a T-sejtes zónára és a B-sejtes folliculusokra, melyek az immunválasz egyes lépései számára speciális mikrokozmoszt biztosítanak. A limfociták migrációját (homing) ezekbe a

kompartmentumokba számos kis molekulatömegű kemokin és kemokin-receptor irányítja (Butcher and Picker 1996; Cyster 1999). A lép, a Peyer plakkok és a nyirokcsomók primer folliculusainak sztróma sejtei, FDC-i által expresszált BLC (BCA-1/CXCL13) az érett CXCR5⁺ B-sejtekre gyakorol vonzó hatást (Forster, Mattis et al. 1996; Ansel, Ngo et al. 2000). A naív, nyugvó T-limfociták nagy mennyiségű CCR7 kemokin receptort expresszálnak, ez irányítja migrációjukat a nyirokcsomók extrafollikuláris helyeire/T-sejtes zónáiba (Forster, Schubel et al. 1999). A CCR7 ligandumai – a T-sejt attraktáns kemokinként ismert – a sztróma sejtek által termelt SLC (CCL21), valamint a makrofágok és DC-k által expresszált ELC (CCL19). Antigén-aktiváció után a Th-sejteken a CCR7 mennyisége lecsökken, míg a CXCR5 receptor expressziója megnő, ezáltal a sejtek érzékennyé válnak a BLC kemoattraktáns hatására és bevándorolnak a folliculusokba, ahol a B-sejtek továbbérését segítik (Gunn, Tangemann et al. 1998; Cyster 1999). A CXCR5 (BLR-1) molekula az érett B-limfocitákon kívül a CD4⁺ memória T-sejteken is megjelenik, így a kemokin-receptor a két sejttípus funkciójának szabályozásában vesz részt (Forster, Emrich et al. 1994).

1.1.3. A germinális centrumok kialakulása

A **nyirokcsomók** B-sejtes zónája a nyirokcsomót körülvevő kollagén tok alatti kéregállományban található, ahol a naív B-sejtek, az FDC-k és a MF-ok elsődleges (primer) folliculusokat alkotnak. A kéreg alatti állomány a nyirokcsomó T-sejtes areája, ahol DC-k is láthatók. A velőállomány főleg ellenanyag termelő plazmasejteket és MF-okat tartalmaz. A **lép** szövettanilag két részre bontható: vörös és fehér pulpára. A B- és T-limfociták a fehér pulpa marginális zónáján keresztül hagyják el a vérkeringést és a marginális szinuszon át lépnek be a központi (centrális) arteriolákat körülvevő periarterioláris hüvelybe (PALS). Itt útjaik elválnak: a B-sejtek továbbvándorolnak a folliculusokba, míg a T-sejtek a PALS-ban maradnak, létrehozva a T-sejtes areát (Tarlinton 1998). A T-sejt dependens immunválasz során az antigén által aktivált B-sejtek a primer folliculusokban gyors osztódás eredményeképpen létrehozzák a másodlagos (szekunder) folliculusokat. Az itt kialakuló csíráközpontok (germinális centrumok) speciális mikrokörnyezetet biztosítanak a rendkívül gyors B-sejt osztódás, az osztódó B-sejtek Ig-molekuláinak V génjeiben bekövetkező szomatikus hipermutáció, és a memóriasejt képződés számára. Primer immunizálást követő 2. héten a GC-okban hisztokémiai festés (hematoxin-eozin) alapján két zónát lehet elkülöníteni. A sötét

zónában intenzíven osztódó B-sejtek (centroblasztok) találhatók. A csíráközpont alsó, világos zónáját kicsi, érett centrociták alkotják, melyek FDC-kel kerülnek kapcsolatba, majd a felső világos zónában összetett sejtkölcsönhatások eredményeképpen plazma-, illetve memóriasejtekké differenciálódnak (Carter and Myers 2008).

1.1.4. A B-sejtek antigéntől függő fejlődési folyamata – a GC reakció

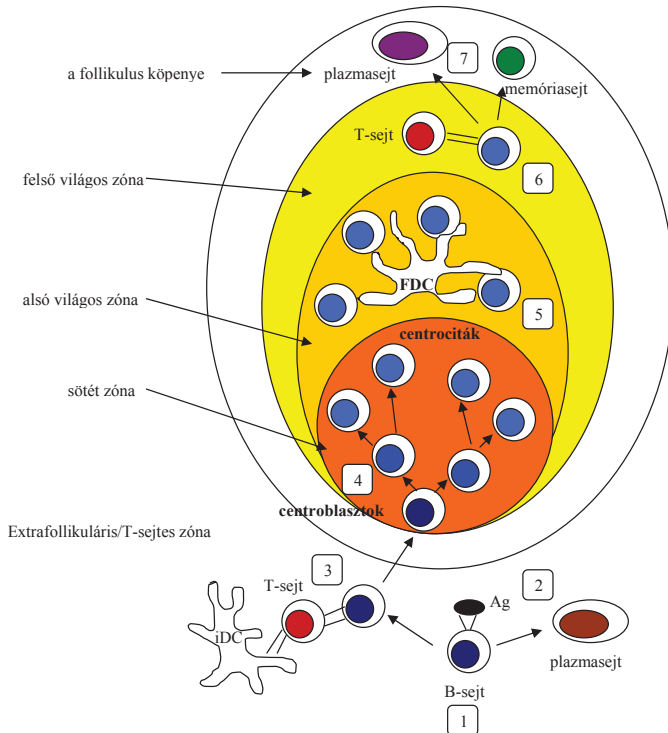
A T-sejt dependens immunválasz első lépése a primer follikuluson kívül, a T-sejtes areában (PALS) történik (Kosco-Vilbois, Zentgraf et al. 1997). A szervezetbe bekerülő antigén 1-2 óra elteltével jut el a másodlagos nyirokszervekbe, ahol a T-sejtes zóna iDC-i prezentálják azt a naív, antigénre specifikus CD4⁺ Th-sejtek számára (Lindhout, Koopman et al. 1997). Azok a T-limfociták, melyek TCR-jeik révén felismerik az MHC II-molekulákon prezentált antigént, aktiválódnak és expresszálják a CD40L (gp39)-t. A naív B-sejtek BCR-jeik révén szintén a PALS-ban aktiválódnak, majd a B-sejtes follikulusok és a T-sejtes zóna határán találkozhatnak az aktivált T-sejtekkel, akiktől érésükhöz szükséges további szignálokat kapnak (Lindhout, Koopman et al. 1997; Garside, Ingulli et al. 1998). Az aktiválódott B-sejtek egy része rögtön plazmasejté differenciálódik és az elkövetkezendő 10-12 napban IgM, illetve IgG izotípusú ellenanyagot termel, majd apoptózissal elpusztul (Jacob, Kassir et al. 1991; Smith, Hewitson et al. 1996). Az alacsony affinitású immunglobulinok képesek a keringésben lévő antigéneket megkötöni s az így keletkezett immunkomplexek (IC) a komplementrendszeret aktiválni. A létrejött IC-eket a csíráközpontokban található FDC-k – komplement-, illetve Fc-receptoraikon keresztül – kötik meg (Kosco-Vilbois, Zentgraf et al. 1997), így az antigéneket „fogva tartják” a B-sejtek számára.

Más B-limfociták a T-sejtekkel együtt a follikulusokba vándorolnak, ahol a B-limfociták gyors osztódások eredményeképpen oligoklonális (1-3 sejtől álló) csíráközpontokat hoznak létre. A sejtciklus rövid, 6-7 óra alatt lezajlik (Kelsoe 1996). Az osztódások közben az immunglobulin molekulák nehéz és könnyű láncainak variábilis régióit kódoló génekben (Ig V gének) – 1 mutáció/1000bp/osztódás gyakorisággal – random szomatikus hipermutációk történnek (Lindhout, Koopman et al. 1997), így különböző affinitású BCR-t expresszáló B-sejt klónok jönnek létre. Ezek a GC világos zónájában nem osztódó, apoptózis szenzitív, sIg⁺ centrocitákká differenciálódnak. Az FDC-k felszínén IC formájában kötött antigénért a különböző affinitású centrociták között versengés indul. A legnagyobb affinitású BCR-rel rendelkező sejtek megmenekülnek a

programozott sejthaláltól, míg az alacsony affinitású receptorral rendelkező centrociták apoptózissal elpusztulnak (Lindhout, Koopman et al. 1997). Ezeket a MF-ok fagocitálják. A túlélő B-sejtek a GC felső világos zónájában ismét antigént prezentálnak az ide vándorló antigén-specifikus Th-sejtek számára.

A primer antigénre adott válaszreakció során a GC-ok T-sejtes zónáiban létrejövő rövid életidejű plazmasejtek mellett, a B-sejtes areákon belül hosszú életű memóriasejtek is kialakulnak. Ezek a sejtek a GC-ot elhagyva a véráram útján állandó cirkulálást folytatnak a másodlagos nyirokszervek között. Újabb antigéninger hatására képesek gyorsan aktiválódni és nagy affinitású, IgG izotípusú ellenanyagot termelni, ezáltal a kórokozókkal szemben egy hatékonyabb védekezést biztosítanak (Ahmed and Gray 1996; McHeyzer-Williams and Ahmed 1999). A GC-ban lezajló eseményeket az 1. ábra szemlélteti.

A csontvelőben az érett B-sejteken kívül hosszú életű ellenanyag-termelő plazmasejteket is kimutattak, melyek a GC-reakciót követően vándorolnak oda. A szérumban található ellenanyagmennyiség 80%-a e sejtektől származik (Slifka, Antia et al. 1998; O'Connor, Cascalho et al. 2002).



1. ábra. A germinális centrum reakció sématis ábrája.

A naív B-sejtek a follikuluson kívül aktiválódnak (1), majd vagy kis affinitású ellenanyagot termelő plazmasejteké alakulnak (2), vagy kapcsolatba lépnek az iDC-k által aktivált T-sejtekkel (3). Ezek a B-sejtek a T-sejtekkel együtt bevándorolnak a follikulusba, ahol a gyorsan osztódó centroblastok létrehozzák a GC sötét zónáját (4). Eközben BCR géneikben szomatikus hipermutációk történnek. A centroblastok a csiraközpont alsó világos zónájában nem osztódó centrocitákká érnek, melyek között versengés indul az FDC-k felszínén immunkomplex formájában megkötött antigénért (5). A nagy affinitású BCR-rel rendelkező sejtek életben maradnak, míg az FDC-khez nem kötődő centrociták apoptózissal elpusztulnak. Ezeket a MF-ok fagocitálják. A túlélő sejtek a felső világos zónában az itt található T-sejteknek antigént prezentálnak (6). A sejt-sejt kölcsönhatások révén kapott szignáloktól függően vagy plazmasejteké, vagy hosszú életű memória sejteké differenciálódnak (7).

A hatékony immunválasz kialakulásához a T- és B-sejtek szoros és rendezett együttműködésére van szükség, amit egyrészt a sejtfelszíni (stimulátor) molekulák, másrészt szolubilis mediátorok (citokinek) biztosítanak (Armitage and Alderson 1995). A B- és T-limfociták közötti legfontosabb interakciók a **MHC II/peptid-TCR, CD40-CD40L, CD80/86-CD28** molekulapárokon keresztül jönnek létre. E receptor-ligandum kölcsönhatások elősegítik a két sejt aktiválódását és a GC-ok létrejöttét (Choe, Kim et al. 1997).

Az antigénre specifikus aktiváció után számos B- és T-sejt felszíni adhéziós molekula expressziója megnő (CTLA-4, B7-1/B7-2; LFA-1, LFA-2, LFA-3, ICAM-1, VCAM-1, VLA-4) ezek tovább stabilizálják a már kialakult MHC II/peptid-TCR kapcsolatot. A B-sejt aktivációt és proliferációt T-sejt eredetű szolubilis citokinek segítik (IL-2, -4, -5, -6, -10, -13, IFN γ) (Armitage and Alderson 1995).

A TNF receptor családba tartozó CD40 a B-sejtek egyik fontos kostimulátor molekulája, de megjelenik monocitákon, DC-ken, az endotélium és az epitélium sejtein is (van Kooten and Banchereau 2000). Liganduma a CD40L (CD154), melyet elsősorban a CD4⁺ Th-sejtek expresszálnak (Schonbeck, Mach et al. 2000). A Th-sejtek és a B-sejtek között létrejövő CD40-CD40L kapcsolat a B-limfocitákban sejtproliferációt, valamint más kostimulátor és adhéziós molekulák (ICAM-1, B7-1, B7-2) expresszióját indukáló szignálfolyamatokat indít el. E kölcsönhatás egyrészt stimulálja a Bcl-2 családba tartozó apoptózist gátló (anti-apoptotikus) fehérjék (Bcl-2, Bcl-x) expresszióját, másrészt gátolja az apoptózist kiváltó (pro-apoptotikus) fehérjék (Bad, Bax, Fas) funkcióját. Mindezen túl, ez a molekuláris interakció szükséges az ellenanyag izotípusváltásához (Randall, Heath et al. 1998), valamint a memória-, vagy plazmasejtté történő differenciálódáshoz is (Lindhout, Koopman et al. 1997; Sprent 1997). Az X kromoszómához kapcsolt Hiper IgM szindróma (HIGM1) oka a CD40L génjében bekövetkezett mutáció. Ennek következtében az altívalt T-sejteken vagy egyáltalán nem jelenik meg a CD40L, vagy kis affinitással kötődik a CD40 molekulához. Ebben a betegségben szenvedő egyénekben nem alakulnak ki GC-k. Az izotípusváltás kiesése miatt a szérumban csak IgM izotípusú ellenanyagok találhatók, így e betegek az opportunista fertőzésekre is sokkal érzékenyebbek (Callard, Armitage et al. 1993).

A CD28 ligandumai (B7-1/CD80 és B7-2/CD86), melyek a CD40-CD40L interakció hatására jelennek meg az aktiválódott B-sejteken, az Ig szupergén családba tartoznak (Chambers and Allison 1997). A T-sejteken konstitutívan expresszáldó CD28 a B-sejteken megjelenő B7-1 és B7-2 molekulákon keresztül pozitív szignálokat közvetít

(Oosterwegel, Greenwald et al. 1999). A T-limfocitákon aktiválás hatására megjelenő CTLA-4 kb. 20x nagyobb affinitással köti a B7-1 és B7-2 molekulákat, mint a CD28, és a T-sejtek számára közvetít negatív jeleket (Hathcock, Laszlo et al. 1994; Walunas, Lenschow et al. 1994; Walker and Smith 2008)

A CD28-CD86, vagy a CD40-CD40L interakciók zavara a kialakult GC-ok széteséséhez vezet (Han, Hathcock et al. 1995), ennek ellenére véletlenszerű GC-ok kialakulását Th-sejtek nélkül, CD40, illetve CD28 szignál hiányában is kimutatták (de Vinuesa, Cook et al. 2000). Habár a Th-sejt független GC-ok szövettanilag hasonlóak a tipikus Th-sejt-regulált GC-okhoz, vagyis megtalálhatók az immunkomplexekeket hordozó FDC-k és a GC fenotípussal jellemezhető B-sejtek (Fazilleau, Mark et al. 2009), de ezek a TI GC-ok hamar szétesnek, és a BCR génekben nem történik meg a szomatikus hipermutáció sem (de Vinuesa, Cook et al. 2000; Toellner, Jenkinson et al. 2002). Tehát a GC Th-sejtek jelenléte a GC mikrokörnyezet kialakulásához nem szükséges, de a későbbi GC B-sejt szelekciós eseményekhez és a nagy affinitású memória B-sejtek kialakulásához azonban elengedhetetlen.

1.1.5. Újabb germinális centrum modellek

Az elmúlt kb. 10 év során a germinális centrumok újra a figyelem középpontjába kerültek a multi-foton képalkotó vizsgálatok által. Ezek az eredmények a „klasszikus modell” alapjait alátámasztva, illetve megkérdőjelezve új megvilágításba helyezték a germinális centrumok dinamikájáról, térbeli szerveződéséről, a B-sejt migrációról, szelekcióról és a differenciálódásról alkotott elképzelést.

Több munkacsoport megfigyelése alapján a GC B-sejtek polarizált formát mutatnak, és sokkal mozgékonyabbak, mint ahogy ezt eddig gondolták. A sötét és világos zóna között CXCL13-függő, dinamikus vándorolást folytatnak, mozgásuk során alakjuk dendritikus sejtekre emlékeztető (pszeudopodiumok). A naív, follikuláris köpeny B-sejtek és a plazmasejtek alakja többnyire kerek. Mind a sötét, mind a világos zónában kimutathatók osztódó és apoptotizáló sejtek is.

A GC B- és T-sejtek között a gyakori találkozások helyett csak néhány stabil kontaktus alakul ki, s azt is megfigyelték, hogy a T-sejtek szállítják az apoptotizált B-sejt blebeket. Ezen megfigyelések alapján úgy gondolják, hogy a GC B-sejt szelekcióban az FDC-ken immunkomplexben fogvatartott antigénért történő kompetíció helyett a Th-sejtekért folytatott versengésnek van nagyobb szerepe (Allen, Okada et al. 2007; Hauser, Junt et al. 2007; Schwickert, Lindquist et al. 2007).

1.2. Amit a GL7 epitópról tudunk

A GL7 epitóp elnevezése egy egér B- és T-limfociták által expresszált, 35 kDa molekulatömegű, késői aktivációs antigént felismerő monoklonális patkány IgM klón nevéből származik. *In vitro* poliklonális aktivátorokkal (LPS, IL-5, anti-IgM) történő stimulust követően a B-sejtek 70-80%-a, míg optimális aktiválódási feltételek mellett a lép T-sejtek összessége (bár két eltérő mértékű expressziót mutató populációt alkotva) GL7⁺-vá válik (Laszlo, Hathcock et al. 1993; Hathcock, Pucillo et al. 1995). Az expresszió az aktivációt követően 60 órával éri el a maximumát. DNS-, RNS- és fehérjeszintézis gátlók egyaránt gátolják a GL7 epitóp kifejeződését (Laszlo, Hathcock et al. 1993). A GL7⁺ B-limfociták a GL7⁻ B-sejtekkel összehasonlítva jobb proliferációs, hatékonyabb antigénbemutató és ellenanyagtermelő képességgel rendelkeznek (Laszlo, Hathcock et al. 1993; Cervenak, Magyar et al. 2001).

Egér csontvelőben már a pro-B/korai pre-B-sejteken megjelenik, expressziója a nagy pre-B-sejteken megnő, majd az éretlen B-sejteken csökken és az érett, naív, nyugvó IgM⁺ IgD⁺ B-limfocitákról eltűnik. Így differenciált megjelenése a B-sejt érés egyes stádiumaiban elsősorban a ciklusban lévő, osztódó sejteket jellemzi. (Cervenak, Magyar et al. 2001; Murasawa, Okada et al. 2002) (4. ábra). Az epitópot a tímuszban a TCRαβ⁺CD4⁺CD8⁻ és a TCRγδ⁺ - timociták egy részén is kimutatták (Hathcock, Pucillo et al. 1995). Immunizálatlan állatok lépében – a genetikai háttértől, illetve az állatházi körülményektől függően – a B-sejtek 0-9%-a, a T-sejtek 0-1%-a expresszálja a GL7 epitópot (Laszlo, Hathcock et al. 1993).

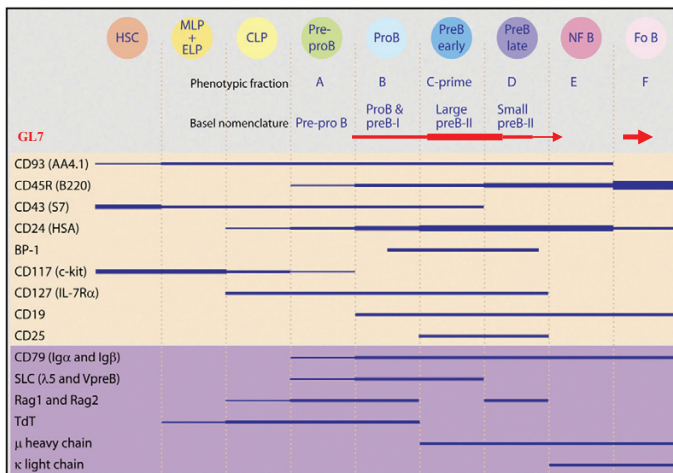
A primer immunizációt követő 4-5. napon megjelenő GC-ba belépő IgM⁺ IgD⁺ CD23⁺ érett B-sejtek idővel IgD⁻ CD23⁻ fenotípusúvá válnak, míg a GL7 sejtfelszíni expressziója és a PNA-val való festődés mértéke megnő (Han, Zheng et al. 1996). Ez szoros összefüggést mutat a RAG 1, 2 expresszióval (Han, Dillon et al. 1997). A PNA – mely elsősorban egy a galaktozil-β1-3-N-acetilgalaktózamin szénhidrát oldalláncot felismerő növényi lektin – régóta a GC B-sejtek elfogadott sejtfelszíni markere, így mivel az egér nyirokcsomó és a lép GL7 festési mintázata megegyezett a PNA-éval, a GL7 epitóp elterjedt geminális centrum markerré vált egerekben (Han, Zheng et al. 1996; Han, Dillon et al. 1997; Otero, Anzelon et al. 2003; Virgo, Denning-Kendall et al. 2003). Miller és társai leírták, hogy idős egerekben a GC-ok nagysága és száma a fiatal állatokéhoz képest lecsökken, s a PNA⁺ germinális centrum B-sejteken a GL7 és B7-2 molekulák sem

expresszálódnak (Miller, Kelsoe et al. 1994). A germinális centrumokban elmarad az Ig V_H gének szomatikus hipermutációja, ami humorális immundeficienciához vezet. Fiatal egerekben B7-2 specifikus ellenanyaggal (GL1) történő kezelés ugyanilyen csökkenő immunválaszt eredményez (Miller and Kelsoe 1995).

Schlüter és munkatársai kimutatták a GL7 epitópot egészséges és *Toxoplasma gondii*-fertőzött egerek agyának különböző sejtjeiben (szubletomeningeális és szubependimális asztrocitákon, a plexus choroideus epitelsejtjein) is. Nincs viszont jelen az agyi véredények sejtjein, az oligodendroglia sejtjein, az ependimán és a plexus choroideus makrofágjain sem. Asztrocitákon *Toxoplasma* fertőzés hatására megfigyelték a GL7 expresszió növekedését, a GL7 és a HSA (hő stabil antigén/CD24) expresszió növekedése közötti korrelációt, valamint az asztrociták gyulladásos léziók köré csoportosulását, ami utalhat az epitóp szerepére az asztrociták gyulladásos folyamatokkal kapcsolatos tevékenységében. Ezek a sejtek segítenek megakadályozni a gyulladás továbbterjedését, stabilizálják a vér-agy gátat és szerepük lehet a Tc-k és a MF-ok működésének serkentésében is (Deckert-Schluter, Buck et al. 1999).

Az epitópot felismerő ellenanyag IgM izotípusa valamint az epitóp expresszióját vizsgáló, anyagcsere gátló tunikamicinnel (László Glória nem közölt adatok) végzett kísérleteink alapján már régebben gyanítottuk az epitóp szénhidrát természetét. Naito és munkatársai nemrég a Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc szénhidrát oldalláncot azonosították a GL7 ellenanyag által felismert epitópként (Naito, Takematsu et al. 2007).

Mindezidáig nem sikerült azonban azonosítani az epitópot hordozó sejtfelszíni molekulát, továbbá, bár az érés és az aktiváció során történő differenciált megjelenés felveti a molekula adhéziós és/vagy aktivációs folyamatokban betöltött szerepét, a pontos funkció felderítése még a jövő feladata.



2. ábra. A GL7 epitóp megjelenése egér limfocita-ontogenezis során (Hardy, Kincade et al. 2007).

A GL7 epitóp a csontvelőben zajló B-sejt fejlődés során a pro-B, korai pre-B-sejteken és a késői pre-B-sejteken található meg (piros nyíl). A csontvelőt elhagyó NF B-sejtek már nem expresszálják az epitópot. HSC: hemopoetikus őssejt; MLP: mieloid-limfoid progenitor; ELP: eritroid-limfoid progenitor; CLP: közös limfoid progenitor; NF B: újonnan alakult B-sejt; Fo B: follikuláris B-sejt.

1.3. Sziálsavak és sziálsavkötió lektinek (sziglekek)

A glikoziláció, mint enzimatikus folyamat, a fehérjékhez, lipidekhez, illetve más cukrokhoz kapcsolt glikánok széles repertoárját hozza létre. Egyre nő azoknak a tanulmányoknak a száma, melyek a glikoziláció fontosságát hangsúlyozzák a patogének felismerésében, a homeosztázis és a gyulladásos folyamatok szabályozásában, az adaptív immunrendszer sejtjeinek érésében, aktiválásában (Marth and Grewal 2008).

Sziálsavaknak nevezzük a deuteroszómákban (tűskésbőrűek, gerincesek) nagy mennyiségben expresszálódó, 9 C-atomból álló cukrok alkotta családot, melyek neuraminsavból (Neu), vagy ketodeoxynonulosonsavból (KDN) származnak (Crocker and Varki 2001). Emlősejtekben tipikusan a sejtfelszíni fehérjékhez, vagy lipidekhez kapcsolt oligoszacharid láncok nem-redukáló végén találhatók. Így, az endogén lektinek mellett különböző patogének (vírusok, baktériumok) számára is felismerhetők (Varki 1997; Varki and Varki 2007). A cukrok szubterminális végéhez a – glikoziltranszferázok családjába

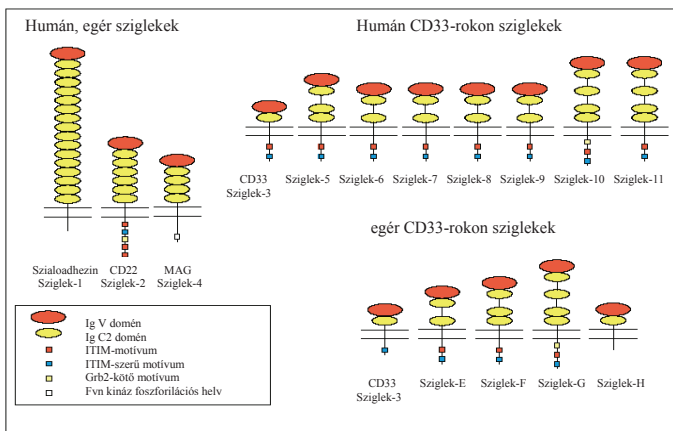
tartozó – szialiltranszferázok által α 2-3, α 2-6, vagy α 2-8 glikozidos kötéssel kapcsolódhatnak (Takashima 2008). Molekuláris és sejtes interakció szabályozásában vesznek részt (Schauer 2009).

A **sziglekek** (szíalsavkötő Ig-szerű lektinek) immunglobulin-szerű doménekből épülnek fel és az emlős immunsejtek számos funkcióját (sejt-sejt interakciók, jelátviteli folyamatok) szabályozzák (Crocker, Clark et al. 1998; Varki and Angata 2006; Crocker, Paulson et al. 2007). N-terminális részükön egy Ig V domén található, amit különböző számú (1-16) Ig C2 domén, majd egy transzmembrán domén, végül egy citoplazmatikus rész követ (Crocker, Clark et al. 1998). A szíalsav felismerésben az Ig V doménnek van szerepe, de a kötés kialakításához a 2. domén is hozzájárulhat (Nath, van der Merwe et al. 1995).

A nyugvó T-sejtek kivételével a legtöbb humán és egér immunsejt expresszál legalább egy szigleket, melyek a szialilált ligandumokra nézve egyedi specificitással rendelkeznek. Az egyes sziglekek eltérő expressziós mintázatot mutatnak, így különböző, de részben átfedő funkciókat irányítanak (Crocker, Paulson et al. 2007).

A sziglekek emlősökben egy evolúciósan konzervált (Sziglek-1, 2, 4, 15), és egy gyorsan evolválódó (CD33-rokon sziglekek: Sziglek-3, 5-14, and -16 a főemlősökben, valamint Sziglek-3 és E-H a rágcsálókban) csoportba sorolhatók (Varki 2009). A fontosabb humán és egér sziglekeket az 3. ábra és a 1. táblázat mutatja be.

A CD22, és a CD33/Sziglek-3-rokon sziglekek többségének citoplazmatikus részén ITIM-és/vagy ITIM-szerű motívumok találhatók, ami jelátviteli folyamatokban betöltött negatív szabályozó szerepükre utal (Crocker and Varki 2001). Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, hogy e sziglekek az Src tirozinkinázok általi tirozin foszforilációt követően protein tirozinfoszfátázokkal (SHP-1 és/vagy SHP-2) kerülnek kapcsolatba (Taylor, Buckley et al. 1999; Paul, Taylor et al. 2000; Yu, Lai et al. 2001). Habár az ITIM foszforilációja fontos a folyamatban, Avril és munkatársai kimutatták, hogy a Sziglek-5 ITIM foszforiláció nélkül is képes SHP-1-et toborozni és gátló jeleket közvetíteni (Avril, Freeman et al. 2005). A sziglekek jelátvitelben betöltött szerepéről szerzett ismereteinket tovább bonyolítja az a felfedezés, hogy ITIM-motívumot nem tartalmazó sziglekekről (CD33-rokon sziglekek: Sziglek-13, -14, -15, -16, és -H) kimutatták, hogy aktiváló és gátló jeleket egyaránt közvetíteni képes, ITAM-tartalmú adaptor proteinnel (DAP-12/KARAP) kapcsolódnak. (Angata, Tabuchi et al. 2007; McMillan and Crocker 2008; Varki 2009).



3. ábra. A humán és egér sziglecek (Crocker 2005).

A sziglecek egyre bővülő családjának tagjai egy evolúciósan konzervált és egy gyorsan evolválódó (CD33-rokon sziglecek) csoportba sorolhatók.

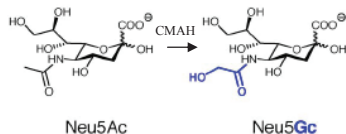
A mielin-asszociált glikoproteinnel (MAG) strukturális és funkcionális homológiát mutató Schwann sejt mielin proteint (SMP)/Siglec-4b-t eddig csak madarakban írták le, humán homológja nem ismert (Crocker, Clark et al. 1998). A sziglek-7 (p70/AIRM-1) és a sziglek-9 között nagyfokú, 80%-os szekvencia homológiát mutattak ki (Zhang, Nicoll et al. 2000), azonban expressziós mintázatuk különböző. Mindkét sziglek a T-sejtekben is gátló funkcióval bír (Ikehara, Ikehara et al. 2004). Az egér eozinofil granulocitákon expresszáldó sziglek-F az allergén válaszban mint negatív szabályozó vesz részt (Zhang, Angata et al. 2007).

Alternatív név humán/egér sziglek	sziálsav-kötő specifititás	expresszió	referencia
Szialogdezin hSziglek-1/CD169 mSziglek-1	2,3>2,6>2,8	MF	(Crocker, Mucklow et al. 1994; Hartnell, Steel et al. 2001)
CD22 hSziglek-2/mSziglek-2	2,6	B	(Wilson, Fox et al. 1991; Powell, Sgroi et al. 1993; Sgroi, Varki et al. 1993)
CD33 hSziglek-3/mSziglek-3	2,6>2,3	My-pro, mo	(Freeman, Kelm et al. 1995)
MAG hSziglek-4a/mSziglek-4	2,3>>2,6	oligo, Schwann	(Kelm, Pelz et al. 1994)
hSziglek-5/CD170	2,3=2,6>2,8	mo, neutr.gr., B, DC, szöv MF	(Cornish, Freeman et al. 1998; Virgo, Denning-Kendall et al. 2003)
hSziglek-6/ OB-BP1/CD327		plac troph, B	(Patel, Brinkman-Van der Linden et al. 1999)
hSziglek-7/ p75/AIRM-1/CD328	2,8>>2,6>>2,3?	mo, NK, T	(Nicolli, Ni et al. 1999; Angata and Varki 2000)
hSziglek-8	2,3>2,6	Eos, Baso, Mast (in vitro)	(Floyd, Ni et al. 2000)
hSziglek-9/CD329 mSziglek-E	2,3=2,6	mo, neutr. gr., NK, B, T	(Angata and Varki 2000)
hSziglek-10/mSziglek-G	2,3=2,6	mo, NK, B?, Eos?	(Munday, Kerr et al. 2001; Whitney, Wang et al. 2001)
hSziglek-11	2,8	MF, mikroglia	(Angata, Kerr et al. 2002)
mSziglek-H		DC, MF	(Zhang, Raper et al. 2006)
mSziglek-F	2,3	Myelo-mo, Eos	(Angata, Hingorani et al. 2001)

1. táblázat. A humán és az egér sziglek expressziója és sepcifitása.

My-pro: mieloid-progenitor; mo: monocita; oligo: oligodendroglia; Schwann: Schwann sejt; neutr.gr./Eos/Baso: neutrofil/eozinofil/bazofil granulocita; Mast: hízósejt; NK: természetes ölösejt (NK-sejt); Myelo-mo: mielomonocita.

A sziálsavak jeles képviselője a legtöbb emlősben megtalálható N-glikolilneuraminsav (Neu5Gc), mely a másik gyakori sziálsav, a N-acetilneuraminsav (Neu5Ac) oxidatív



formája (Varki 2001). A Neu5Ac Neu5Gc formába történő konvertálásáért a citidin monofoszfát-N-acetilneuraminsav hidroxiláz (CMAH) enzim felelős (Varki 2009).

Egészséges emberi szövetekben Neu5Gc nem fordul elő, csak tumorokban és főtájis szövetekben, ami arra utalna, hogy a CMAH gén születés után inaktívalódik, illetve tumor sejtekben újból aktiválódik. Ez a teória azonban 1998-ban megdőlt, amikor két, egymástól független csoport az emberi CMAH génben egy irreverzibilis inaktivációt okozó mutációt mutatott ki (Chou, Takematsu et al. 1998; Irie, Koyama et al. 1998), aminek következtében a humán enzim funkcióképtelenné vált (Chou, Takematsu et al. 1998; Patel, Brinkman-Van der Linden et al. 1999).

Az α 2-6 kapcsolt szialsavak N-glikánokhoz kapcsolásában az *ST6GAL I* gén által kódolt, számos szövetben megtalálható és szövetspecifikus expressziót mutató, β -galaktozid- α 2-6-szialisztransferáz (ST6Gal I) enzim vesz részt (Paulson and Colley 1989; Paulson, Weinstein et al. 1989; Takashima 2008).

A limfociták differenciációja és aktivációja együtt jár a sejtfelszín glikozilációjának változásával. A B-sejtek érése és aktivációja összefügg az ST6Gal I megnövekedett szintjével, míg T-sejtek esetében ennek pont fordítottját figyelték meg: CD4, CD8 T-sejtek aktiválódása közben a ST6Gal I enzim szintje lecsökkent (Hennet, Chui et al. 1998; Comelli, Sutton-Smith et al. 2006).

1.4. Az ösztrogén hatásai a szervezet fiziológiai folyamataira

A HPG tengely végpontjában felszabaduló, szteroid hormonok családjába tartozó ösztrogén (E2), valamint más ösztrogén-alapú szteroidok, mint az öszttron (E1), és az ösztrol (E3) a szervezetben számos fiziológiai folyamatot regulál (Prossnitz, Oprea et al. 2008).

Fontos szerepe van a reprodukcióval kapcsolatos funkciók szabályozásában (pl. emlőmirigyek, gonádok fejlődése, működése, szexuális viselkedés), biztosítja a **csontok integritását**. A klimaxkori oszteoporózis (csonttritkulás) kórtanában az egyik legfontosabb faktor a petefészek csökkenő működése általi ösztrogénhiány (Erben, Raith et al. 1998).

Az ösztrogén részt vesz az **erek integritásának** megőrzésében. Az éreresedés gyakorisága klimax előtti nőkben alacsonyabb, mint férfiakban, míg klimax után emelkedés tapasztalható, de ösztrogénpótló terápia során javulás figyelhető meg. Az ösztrogén vérerekre kifejtett direkt hatása révén kardioprotektív szereppel is bír (Hisamoto, Ohmichi et al. 2001).

Több bizonyíték létezik a nemi hormonok **neuroprotektív** funkciójára vonatkozóan. Így pl. Alzheimer betegségben kimutatták az ösztrogén és az androgének védő szerepét az

agyan plakk képződést kialakító β -amiloid peptid ($iA\beta_{1-42}$) idegsejtekre kifejtett toxikus hatása ellen (Zhang, Champagne et al. 2004).

Mindezek mellett a gonadális szteroidok hatnak az **immunrendszerre**: az immusejtek fejlődésére, a nyirokszervek és az immunsejtek érésére, és a humorális és a celluláris immunválaszra is (Tanriverdi, Silveira et al. 2003).

Számos tanulmány igazolja, hogy a szteroid hormonok fontos szerepet játszanak a B és a T limfopoézis szabályozásában. Terhesség, illetve egerekben ösztrogén kezelés során a csontvelői B limfocita prekursorok száma lecsökken, míg ovariectomizált egérben abnormálisan megnő (Medina, Smithson et al. 1993; Smithson, Beamer et al. 1994; Smithson, Medina et al. 1995). Vatchkova és munkatársai kimutatták, hogy az ösztrogén elősegíti a csontvelői prekursorokból történő $CD11c^{+}CD11b^{int}$ DC-k differenciációját. A létrejövő sejtek funkcionális APC-ként (MHC II^{+} $CD86^{+}$ sejtek) képesek antigént prezentálni a $CD4^{+}$ T-limfociták számára (Paharkova-Vatchkova, Maldonado et al. 2004). Az ösztrogén közvetlenül hat a makrofágokra is, azok gyulladásai citokin (TNF- α , IL-1, IL-6) termelését csökkenti (Deshpande, Khalili et al. 1997; Kramer and Wray 2002).

In vitro és *in vivo* eredmények is igazolják, hogy a nemi hormonok a limfociták citokintermelését is befolyásolják. Több munkacsoport is beszámolt arról, hogy a 17β -ösztadiol humán $CD4^{+}$ T-sejt klónokban dóziszfüggően modulálja mind a pro- és mind az anti-inflammatorikus citokinek szekrécióját (Correale, Arias et al. 1998; Verthelyi and Klinman 2000). Nagy mennyiségű ösztrogén serkenti a Th2-es típusú anti-inflammatorikus citokinek (IL-4, IL-10, TGF β) termelését, ezáltal gátolja a sejtmediált immunválaszt (Naito, Takematsu et al. 2007). Ezt alátámasztják a terhesség során, az autoimmun betegségekben tapasztalt megfigyelések is. A magas ösztrogénszinttel jellemezhető terhesség alatt ugyanis a Th1-es típusú, celluláris immunválaszhoz kötődő betegségekben (mint a szklerózis multiplex) jelentős javulást írtak le (Confavreux, Hutchinson et al. 1998), míg szülést követően a tünetek súlyosbodásáról számoltak be. Ezzel szemben a humorális immunválasz felerősödésével járó autoimmun betegségek (pl. SLE) során a páciensek állapota terhesség alatt romlott (Petri, Howard et al. 1991; Ruiz-Irastorza, Lima et al. 1996).

Számos irodalmi adat mutatja, hogy bizonyos immunológiai folyamatok nemi megoszlást mutatnak. TD és TI antigénnel való immunizálást követően nőstény egerekben erőteljesebb ellenanyag termelést és T-sejt aktivációt mutattak ki, mint hímegekben (Eidinger 1972 exp med). Továbbá bizonyított, hogy nőknél magasabb a szérum Ig-koncentráció, a

CD4⁺ T-sejtpopuláció aránya, a fertőzésekre adott válasz során termelődő citokinek mennyisége (Smithson, Beamer et al. 1994; Wilder 1998; Olsen and Kovacs 2002). Androgén és ösztrogén receptorokat B-, T- és mieloid sejtek is expresszálnak, ami azt jelzi, hogy a nemi hormonok (E2 és T) képesek közvetlenül modulálni az immunválaszban résztvevő sejtek funkcióját (Bebo, Schuster et al. 1999; Komi and Lassila 2000).

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy környezeti faktorok, különféle kemikáliák fontos szerepet játszanak az immunrendszer szabályozásában. Így például a klórtartalmú rovarirtó szerek (pl. methoxychlor, chlordecone) lupus-prone egerekben felgyorsítják az autoimmun betegség megjelenését, hasonlóan ösztrogén kezelés esetén (Sobel, Gianini et al. 2005).

A germinális centrumok, amellet, hogy megfelelő mikrokörnyezetet biztosítanak az ellenanyag izotípusváltás, az Ig V génekben bekövetkező szomatikus hipermutáció, a memória sejtek képződése számára, szinterei az autoimmun betegségek kialakulásában szerepet játszó B-sejt tolerancia összeomlásának, az immunfolyamatok szabályozásában bekövetkező zavaroknak is (Wen, Pao et al. 1996). Bynoe és társai leírták, hogy az ösztrogén kezelés növeli a germinális centrum sejtek Bcl-2 expresszióját, ezáltal az autoreaktív B-sejt klónok túlélését (Bynoe, Grimaldi et al. 2000).

Ismert, hogy egyes autoimmun betegségek előfordulási gyakorisága jóval nagyobb nőkben, mint férfiakban. A legnagyobb nemi dimorfizmust a Sjögren szindróma, a szisztémás lupus erithematosus (SLE), egyes autoimmun pajzsmirigy betegségek (Hashimoto tiroiditisz, Graves-kór) mutatják, ahol a betegek >80%-a nő. Ez a gyakoriság rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis, sclerosis multiplex esetében valamivel kevesebb, 60-75%, míg az inzulin-függő diabétesz mellitusz (IDDM) 1:1-es férfi: női arányt mutat (Whitacre 2001). Ez a nemi dimorfizmus fertőző betegségek patogenezisében is megmutatkozik (Barna, Komatsu et al. 1996; Han, Lundberg et al. 2001). Mindezen megfigyelések a hormonok immunrendszert moduláló hatására hívják fel a figyelmet.

Általánosságban elmondható, hogy az ösztrogének immunstimuláló, míg az androgének immunszuppresszálo hatással rendelkeznek (Cutolo, Seriolo et al. 2002).

1.4.1. Az ösztrogén genomiális és nem-genomiális hatásainak rövid áttekintése

A szteroid hormonok hatásukat klasszikus/genomiális és nem-klasszikus/nem-genomiális útvonalakon fejtik ki. A klasszikus, genomiális hatásuk során specifikus intracelluláris receptorokhoz kötődnek, melyek a target gének expresszióját pozitívan, vagy negatívan szabályozzák (Beato and Klug 2000). Ezek a hatások lassabbak, a géntranszkripciós változások csak órák, napok múlva figyelhetők meg, valamint transzkripciót (aktinomycin D), illetve translációt gátló (cikloheximid) szerekre érzékenyek. Ezzel szemben, a nem-genomiális hatások gyors, már másodperceken, percekben belül bekövetkező változásokkal jellemezhetők, melyek transzkripciós és translációs inhibitorok jelenlétében is végbemennek (Simoncini and Genazzani 2003; Norman, Mizwicki et al. 2004).

1.4.2. Genomiális hatások

A gonadális szteroidok közé tartozó ösztrogén klasszikus hatását magi receptorain keresztül fejtik ki. Ezek, mint ligand-függő transzkripciós faktorok közvetlenül szabályozzák a génátírást. A receptoroknak két formájuk ismert: az 1973-ban patkány uterusban karakterizált, majd 1985-ben MCF-7 tüdőrák sejtekből klónozott ER α (Jensen and DeSombre 1973; Walter, Green et al. 1985), és a 90-es évek végén felfedezett ER β (Kuiper, Enmark et al. 1996; Mosselman, Polman et al. 1996).

Az ösztrogén receptorok, mint minden szteroid hormon receptor, multidomén szerkezettel jellemezhetők. A variábilis N-terminális domént a centrálisan elhelyezkedő ciszteinben gazdag/2 Zn-ujjat tartalmazó, konzervált DNS-kötő domén követi, majd egy flexibilis kapocs régió után található a C-terminális specifikus, ligandkötő/hormonkötő domén. Az N-terminális és a ligandkötő domének ligand-független transzaktiváló funkcióval is rendelkezik (AF-1, illetve AF-2) (Beato and Klug 2000). A két receptor nagyfokú homológiát mutat, így pl. a DNS-kötő doménjük >90%-ban, míg ligandkötő doménjük ~55%-ban azonos (Mosselman, Polman et al. 1996). A transzkripciós aktivitásért felelős domének azonban csak 18%-os egyezést mutatnak. Szöveti eloszlásuk és expressziós mintázatauk átfedő, de nem azonos. Ezek alapján feltételezhető, hogy a két receptor funkciójában is eltér egymástól.

Az ösztrogén lipofil természeténél fogva egyszerű diffúzióval jut át a sejtmembránon (Allera and Wildt 1992), majd a target sejben nagy affinitással kötődik specifikus receptorához. Ez a kapcsolat a receptorban olyan konformációváltozást idéz elő, aminek eredményeképpen a receptor leválik az őt inaktív formában tartó citoplazmatikus chaperon fehérjéről (pl. Hsp90, immunophilin) (Pratt and Toft 1997; DeFranco and Csermely 2000). Így lehetővé válik a receptor-ligand (R-L) komplex magi transzlokációja, a receptor dimerizációja, valamint kofaktorokkal történő asszociációja. Ezt követően a dimerizálódott R-L komplex vagy közvetlenül kötődik a target gén promoterében található ERE/HRE elemhez, vagy más DNS-kötő transzkripciósfaktorokhoz (pl. AP-1, Sp-1, NFκB) kapcsolódva regulálja a génátírást. E direkt kölcsönhatás mellett a R-L komplex indirekten, a receptor hatását módosító kofaktorokkal (koaktivátorok, korepresszorok) is kapcsolódhat (Beato and Klug 2000). A szteroid-indukálta transzkripcióban szerepet játszó legismertebb koaktivátorok a Src-1 (steroid receptor coactivator 1) (Onate, Tsai et al. 1995) és a CBP (CREB-binding protein) (Kamei, Xu et al. 1996), míg a N-CoR (nukleáris receptor korepresszor), SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor), Alien (Dressel, Thormeyer et al. 1999) molekulákat korepresszorként írták le. Kimutatták, hogy az ER képes ligand-független úton, más intracelluláris jelpályákon keresztül is aktiválódni: pl. az EGF receptor aktivációja MAPK útvonalon az ERα foszforilációjához vezet (4. ábra) (Bunone, Briand et al. 1996). Korábbi elképzeléssel ellentétben az ERα és ERβ nemcsak homo-, hanem heterodimer formában is kötődhet a célgén promóterének palindrom ERE szekvenciájához (Pettersson, Grandien et al. 1997).

1.4.3. Gyors, nem-genomiális hatások

Többféle sejten és szövetben kapott kísérleti eredmények bizonyítják, hogy a klasszikus szteroid receptorok nemcsak a genomiális, hanem gyors nem-genomiális hatásokat is kiváltanak (Pappas, Gametchu et al. 1995; Hisamoto, Ohmichi et al. 2001). Az ösztrogén nem-genomiális hatása számos intracelluláris jelátviteli útvonalat aktivál, mint a MAPK/ERK, foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K)/Akt kaszkád. Indukálja ioncsatornák nyitását, G-fehérjéhez kapcsolt másodlagos hírvivők (cAMP, Ca²⁺) képződését, valamint növekedési faktor receptorok stimulálásában is szerepet játszik (Razandi, Alton et al. 2003). Minthogy az ösztrogén receptor saját kinázaktivitással nem rendelkezik, más jelátvivő molekulákkal kapcsolódva ún. „szignáloszómákba” rendeződve vesz részt a gyors

hatások közvetítésében. A szignalszómáknak tagjai lehetnek G-fehérjék (G α i), hősokk proteinek (Hsp90), caveolin-1, mátrix metalloproteinázok (MMP), Sch, Modulator of nongenomic activity of estrogen receptor (MNAR) és a c-Src (Falkenstein, Tillmann et al. 2000; Moriarty, Kim et al. 2006; Prossnitz, Arterburn et al. 2007).

Habár ösztrogénköti helyek létezését endometriális sejtek membránjában, valamint az ösztrogén ezen keresztül gyors hatását már 1977-ben leírták (Pietras and Szego 1977), mindezidáig nem sikerült a magi receptoroktól szerkezetileg eltérő, membrán lokalizációs szignállal rendelkező ösztrogén receptort azonosítani.

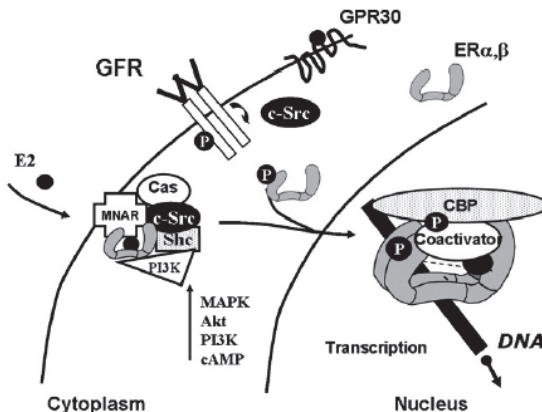
Egyre több *in vivo* és *in vitro* tanulmány igazolja, hogy a membránban lokalizált ösztrogén receptorok azonosak a magi receptorokkal (Pappas, Gametchu et al. 1995; Norfleet, Thomas et al. 1999; Razandi, Pedram et al. 1999; Li, Haynes et al. 2003). Mindegyikük képes genomiális és nem-genomiális ösztrogén hatást is közvetíteni. Chambliss és munkatársai endoteliális sejtekben specifikus membránstruktúrákhoz, kaveolákhoz asszociálódva mutattak ki ER-okat (Chambliss, Yuhanna et al. 2002). Több tanulmány szerint a klasszikus magi receptorok membrán transzlokációjában posztranzlációs módosításoknak, foszforilációnak (Wang, Mazumdar et al. 2002; Balasenthil, Barnes et al. 2004), vagy palmitoilációnak (Razandi, Alton et al. 2003; Acconcia, Ascenzi et al. 2004; Acconcia, Ascenzi et al. 2005) lehet szerepe. Más kísérletek adaptor proteineknek tulajdonítanak fontosságot, melyeknek szerepe van az ER-ok plazmamembránba (Src-homology and collagen homology/Shc) (Evinger and Levin 2005), illetve kaveolákba (MNAR) (Boonyaratankomkit and Edwards 2004) történő áthelyeződésében.

Egyesek leírták ösztrogénköti helyeket intracelluláris membránokban is, mint az endoplazmatikus retikulum (Evans and Muldoon 1991), vagy a mitokondrium (Chen, Delannoy et al. 2004).

2002-ben az agy neokortikális sejteiben írták le az ER α -tól és β -tól funkcionálisan eltérő, plazmamembrán-asszociált ösztrogén receptort (ER-X), mely felnőtt állatokban csak agyi sérülések után mutatható ki (Toran-Allerand, Guan et al. 2002).

Az 1990-es évek végén több csoport is beszámolt egy új, G-fehérjéhez kapcsolt receptorról, a GPR30-ról, emlős limfocitákon, endotél- és idegsejteken (Owman, Blay et al. 1996; Carmeci, Thompson et al. 1997; Takada, Kato et al. 1997; O'Dowd, Nguyen et al. 1998), mely ösztrogénkötiést követően az ERK1/2 útvonalat aktiválja (Filardo, Quinn et al. 2000; Filardo, Quinn et al. 2002; Maggiolini, Vivacqua et al. 2004).

Az ösztrogén gyors, nem-genomiális hatását számos sejttípusban vizsgálták (Losel, Falkenstein et al. 2003; Watson, Alyea et al. 2007), de primer B- illetve T-sejtekkel kapcsolatban nincsenek adatok. Továbbra is vannak megválaszolandó kérdések: milyen a receptor természete, mely részt vesz a nem genomiális hatások közvetítésében, milyen molekuláris mechanizmusok integrálják a hormonális hatásokat, és mi a gyors nem-genomiális hormon hatások fiziológiai szerepe.



4. ábra. Az ösztrogén indukálta jelátviteli utak (Fox, Andrade et al. 2009).

Az ösztrogén a receptorához (ER) kötődve stabilizálja a kialakuló ER dimereket, stimulálja a növekedési faktor receptorral való közvetlen interakciót, az ER-nak adaptor fehérjékhez (c-Src, Shc, MNAR, Cas) történő asszociációját és a közös jelátviteli utak aktivációját. Az ER-t E2 nélkül, a növekedési faktor közvetítésével elindított jelátviteli kaskád is képes aktiválni, ami géntranszkripciót indukál. Mindemellett az ösztrogén a nukleáris receptorok családjába tartozó ER mellett a nemrég felfedezett G-fehérjéhez kapcsoltsmembrán receptoron keresztül is kifejtheti hatását.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A GL7 epitópot eredetileg *in vitro* aktivált egér lépsejteken egy patkány monoklonális ellenanyag kötődése alapján írták le. Az epitóp egérben a B- és T-limfociták érési és aktiváltsági állapotától függő differenciált megjelenési mintázatot mutat, jelen van a B-sejt érés korai stádiumaiban, egyes timocita populációkon, majd a másodlagos nyirokszervekben az aktivált limfocitákat jellemzi, a germinális centrum B-blasztok markere. Nemrég humán sejtvonalakon is kimutatták az ellenanyag kötődését és a Neu5Aca2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc szénhidrát oldalláncot azonosították a GL7 ellenanyag által felismert epitópként. Az epitópot hordozó sejtfelszíni molekulát mindeztáig nem sikerült azonosítani, és noha az érés és az aktiváció során történő differenciált megjelenés felveti a molekula adhéziós és/vagy aktivációs folyamatokban betöltött szerepét, a pontos funkció mindmáig nem tisztázott. Továbbá az epitópot felismerő ellenanyag IgM izotípusa számos módszer esetében komoly nehézségeket okoz.

A fentiek alapján munkánk során a következő célokat tűztük ki:

- A GL7 epitóp kémiai természetének felderítését egér és humán sejteken.
- A GL7 epitóp expressziójának összehasonlító vizsgálatát primer egér , humán és patkány sejteken.
- A GL7 epitóp expresszió *in vitro* aktivációt követő változásának követését humán limfocitákon.
- A GL7 epitópot felismerő ellenanyagnak csak a variábilis doménjeit tartalmazó scFv konstrukció létrehozását.

Jól ismert, hogy a nemi hormonok, így az ösztrogének is befolyásolják a limfociták differenciációját, érését, migrációját, résztvesznek a glikoziláció folyamatának szabályozásában, ezáltal fontos szerepet töltenek be a megfelelő immunválasz kialakításában. Minthogy az ösztrogén humorális immunválaszra kifejtett hatását eddig főként *in vitro* rendszerekben tanulmányozták. Továbbá munkacsoportunk kimutatta intracelluláris és membránkött ER-ok jelenlétét egér B- és T-sejteken, valamint hogy az ösztrogén intracelluláris Ca²⁺-felszabadulást és fehérje foszforilációt (Akt, Erk) indukál. Azonban a nem-genomiális jelátviteli utak nem tisztázottak.

Ezért kísérleteket teveztünk:

- Az ösztrogén T-sejt dependens és a T-sejt independens B-sejt válaszra kifejtett hatásának *in vivo* rendszerben történő vizsgálatára.
- Az ösztrogén NFκB aktivációra gyakorolt nem-genomiális hatásának vizsgálatára.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtek és sejtvonalak

Egér B sejtvonalak: 1-305 (pre-B-sejt); 38C-13 (éretlen B-sejt); 2PK-3, LK-35, A20, TA-3, M12-4.1 (aktivált, érett B-sejtek); X16C (marginális zóna B-sejt)

Egér Monocita-makrofág sejtvonalak: J774A.1, P388D1, WEHI-3, RAW264.7

Egér Th hibridóma sejtvonalak: 2/13/Th0, 5/11, 7/5 és 3/13 / Th2, IP-12 és 7/6 / Th1

Humán sejtvonalak: Ramos, SKW (éretlen B); Raji, HT-58, Bjab, BL41, Daudi (érett B); Jurkat (T-sejt leukémia); THP-1 (monocita leukémia)

Az egér B- és monocita-makrofág valamint a humán sejtvonalak ATCC (American Type Tissue Culture Collection) eredetűek, a Th hibridómák az ELTE Immunológiai Tanszékén készültek.

Egér primer sejtek: 6-8 hetes nőtény C57Bl/6 egerekből izolált lép B- és T-sejtek

Humán primer sejtek: mandulából izolált B-, vérből tisztított T-limfociták, vérből izolált granulociták, monociták, illetve monocita-eredetű dendritikus sejtek

Patkány primer sejtek: lépsejtek

Az egér eredetű sejtvonalakat és primer sejteket 50 μ M 2-merkaptóetanollal és 5% magzati borjúsérummal (FCS) kiegészített komplett RPMI 1640 tápoldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, OR, USA), a patkány lépsejteket 2-merkaptóetanollal és 10% FCS-el kiegészített DMEM médiumban tenyésztettük.

A patkány lépsejteket 2-merkaptóetanollal és 10% FCS-el kiegészített DMEM (Sigma-Aldrich) oldatban tartottuk.

A humán B-limfóma sejteket 10% FCS tartalmú RPMI 1640 médiumban, a humán primer sejteket 10% FCS-el és gentamicinnel kiegészített RPMI 1640 tápoldatban tartottuk.

Az ösztrogénnel végzett kísérleteket megelőzően a sejtvonalakat fenolvörösmentes, 5% szteroidmentes FCS-t tartalmazó, módosított RPMI 1640 tápoldatbaninkubáltuk.

3.2. Oldatok pufferek

- **komplett RPMI tápfolyadék:** RPMI 1640 2 mM L-glutaminnal, 1 mM Na-piruváttal, antibiotikumokkal (Penicillin, Streptomycin) kiegészítve.
- **módosított, szérummentes RPMI tápfolyadék:** RPMI 1640 2 mM L-glutaminnal, 2 mM Na-piruváttal, 50 μ M 2-merkaptoetanollal, antibiotikumokkal (Penicillin, Streptomycin) kiegészítve, fenolvörös nélkül.
- **DMEM tápfolyadék:** 2 mM L-glutaminnal, antibiotikumokkal és 10% FCS-sel kiegészítve.
- **szteroidmentes magzati borjúsérum (FCS)** (Invitrogen/GIBCO, Carlsbad, CA, USA)
- **LB-médium** (Luria-Bertani): 10 g Tripton, 5 g élesztő kivonat, 5 g NaCl
- **STE-oldat:** 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA
- **TE-puffer:** 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA•Na₂, pH8
- **GKN-oldat:** 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 1.77 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0.69 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O, 2 g D-glükóz, 0.01 g fenolvörös 1000 ml desztillált vízben beoldva, pH 7.4
- **PBS:** foszfáttal pufferealt fiziológiás sóoldat, pH 7.4
- **FACS-puffer:** 0.5% FCS és 1 g/l Na-azid tartalmú PBS
- **lízispuffer:** 10 mM Tris, 10 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, 10 mM Na-pirofoszfát, 1% Triton X-100, pH 7.2, 10 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin, 0.2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 2 mM Na-O-vanadát
- **Hank-féle puffer (HBSS):** 143 mM NaCl, 1 mM Na₂SO₄, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM D-glükóz, 10 mM HEPES (N-[hidroxietil] piperazin-N'-[2-etánszulfonsav]), pH 6
- **HEBS oldat:** 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7
- **ACK oldat** (Tris-ammónium-klorid):, 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.2- 7.4
- **30 %-os akrilamid oldat 3.3 % N,N-metilén-bisakrilamiddal**
- **Redukáló mintapuffer:** 0.5 M Tris/HCl, glicerin, SDS, 2-merkaptoetanol, brómfenolkék, pH 6.8

- **Tris-glicin elektródpuffer** (pH 8.3): 3 g/l Tris, 14.4 g/l Glicin, 10 ml/l SDS (10%)
- **Blottoló puffer**: 3 g/l Tris, 14.4 g/l Glicin, pH 8.3
- **Ficoll-Hypaque** (Amersham, Uppsala, Sweden)
- **AET**: 0.14 M aminoetil-izo-tiourónium-bromid-oldat, pH 9 fiziológiás sóoldatban
- **NFκB kimutatására szolgáló pufferek: A-D pufferek** (Shirakawa and Mizel 1989)

3.3. Reagensek, ellenanyagok

- biotin-konjugált egér anti-patkány IgM (MAR2/2 klón, László Glória, ELTE, Budapest)
- FITC-konjugált anti-patkány CD3 (Invitrogen-Caltag, Eugen, OR, USA)
- Alexa 647-tel konjugált kecske anti-patkány IgM (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
- kecske anti-humán IgG+IgM F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)
- anti-humán CD3 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany)
- avidin-FITC (Sigma-Aldrich)
- affinitás tisztított és konjugált monoklonális GL7 ellenanyag (GL7 hibridklón sejtenyészet felülcszójából/László Glória, ELTE, Budapest)
- biotin-konjugált GL7 ellenanyag (eBioscience, Hatfield, UK)
- myc-tag specifikus mIgG1 ellenanyag (9E10, Academisch Ziekenhuis Utrecht, Hollandia)
- FITC-konjugált anti-humán CD4 (ImmunoTools)
- PE-konjugált anti-humán CD8 (ImmunoTools)
- PE-konjugált anti-humán CD14 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- anti-humán CD19 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)
- FITC-konjugált anti-humán CD66abce (Dako, Glostrup, Denmark)
- Alexa 647-el konjugált anti-humán CD11c (AbD Serotec, Oxford, UK)
- APC-konjugált anti-humán CD25 (BD Pharmingen)
- APC-konjugált anti-humán CD69 (BD Pharmingen)
- monoklonális patkány IgM (ROX4 hibridklón terméke, Dr. László Glória, ELTE, Budapest)
- FITC-konjugált mIgG1 (PPV-06, ImmunoTools)
- PE-konjugált mIgG1 (PPV-06, ImmunoTools)

- biotin-konjugált mIgG1 (PPV-06, ImmunoTools)
 - APC-konjugált mIgG1 (MOPC-21, BD Pharmingen)
 - affinitás tisztított mIgG1 (15H6, Southern Biotech, Birmingham, AL)
 - *Vibrio cholerae* baktériumból izolált neuraminidáz (Sigma-Aldrich)
 - Papain enzim *Papaya latex*-ből (Sigma-Aldrich)
 - 17 β -ösztadiol (E2) (Sigma-Aldrich) 100%-os etanolban oldva
 - E2-BSA 17 β -ösztadiol 6-(O-karboximetil)-oxim-BSA (Sigma-Aldrich)
 - E2-BSA-FITC 17 β -ösztadiol 6-(O-karboximetil)-oxim-BSA-fluoreszcein izotiocianát konjugátum (Sigma-Aldrich)
- Az E2-BSA és E2-BSA-FITC preparátumokban levő szabad ösztadiolt ultraszűrőssel távolítottuk el felhasználás előtt
- BSA-FITC marha szérum albumin fluoreszcein izotiocianáttal konjugálva
 - propidium-jodid (Sigma-Aldrich): fluoreszcens DNS-festék, 1 mg/ml koncentrációban PBS-ben oldva
 - H₂O₂
 - tripánkék: vitális festék sejtszámoláshoz, 0,8 g beoldva 500 ml 145 mM NaCl-oldatban
 - monoklonális anti-egér CD3 ellenanyag (145-2C11), hörcsög IgG (ImmunoTools)
 - kecske anti-egér IgM F(ab')₂ ellenanyag (Dr. J. Haimovich, Tel Aviv University, Israel)
 - kecske anti-egér IgM+IgG-HRP (Southern Biotechnology Associates, város, UK)
 - kecske anti-egér IgM-biotin (Southern Biotechnology Associates)
 - kecske anti-humán IgG+IgM F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch)
 - anti-ER α (MC-20) poliklonális nyúl IgG (Santa Cruz Biotechnology)
 - anti-ER β (Z8P1) nyúl ellenanyag (Zymed, San Francisco, CA, USA)
 - nyúl anti-hörcsög IgG (Southern Biotechnology Associates)
 - anti-egér CD24 (HSA) patkány IgG2b κ , M1/69.16.11. (NIH, Bethesda, MD, USA)
 - anti-egér CD24 (HSA) patkány IgM κ , J11d2 (NIH)
 - Alexa 647-tel konjugált anti-egér Thy-1 (CD90) patkány IgG2c κ , (G7.4 hibridklón terméke/ATCC)
 - fikoeritrin (PE) konjugált anti-humán CD3 (ImmunoTools)
 - kecske anti-nyúl IgG (H+L) Alexa Fluor-488 és -647 (Invitrogen-Molecular Probes)

- anti-foszfo-AKT 1/2/3 (Ser473) affinitás tisztított poliklonális nyúl IgG (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-foszfo-p44 (ERK 1) / p42 (ERK2) (pThr202/pTyr204) poliklonális nyúl IgG (Cell Signaling Technology, város, MA, USA)
- anti-foszfo-ERK1 (Thr 202/Tyr204) / ERK2 (Thr185/Tyr187) poliklonális nyúl ellenanyag (Sigma-Aldrich)
- anti-ERK monoklonális egér IgG2a (Transduction Laboratories, város, UK)
- anti-SH-PTP2 poliklonális nyúl IgG, C-18 (Santa Cruz Biotechnology)
- kecske anti-egér IgM + IgG -HRP (Southern Biotechnology Associates)
- kecske anti-nyúl IgG (H+L)-HRP (Southern Biotechnology Associates vagy Dako)
- K9.361 egér FcγRII / III specifikus egér monoklonális IgG2a (NIH)
- hu FcR blokkoló: humán szérumból tisztított IgG
- nyúl anti-p65 NFκB (klón C-20, Santa Cruz Biotechnology vagy P100 klón, Cell signaling Technology Danvers, MA, USA)
- DRAQ5 membrán-permeabilis sejtmagfesték (Biostatus, Leicestershire, UK))
- kecske anti-nyúl IgG (H+L)-HRP (Southern Biotechnology Associates)
- ConA (Sigma-Aldrich)
- LPS (Sigma-Aldrich)
- Biotinnal konjugált PNA (Sigma-Aldrich)
- Biotinnal konjugált SNA (Sigma-Aldrich)
- Biotinnal konjugált MAA II (Sigma-Aldrich)

3.4. MÓDSZEREK

3.4.1. Egér, illetve patkány lépsejtek izolálása, T- és B-sejt szeparálás

A 6-8 hetes C57BL/6/J nőtény egerekből, cervikális diszlokációt követően, eltávolítottuk a lépet. A lépsejteket fenolvörösmentes GKN oldatban mechanikai roncsolással nyertük ki. A vörösvérsejteket 5 ml ACK oldattal lizáltuk.

A T-sejteket MACS mágneses szeparáló rendszerrel izoláltuk (Miltenyi Biotech. GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) a használati útmutatónak megfelelően, negatív szelekciós eljárást alkalmazva. A szeparálás során biotinnal konjugált kecske anti-egér IgM ellenanyagot, anti-biotin ellenanyaggal fedett mágneses szeparáló gyöngyöt (Miltenyi

Biotech.) és LS típusú MACS oszlopot használtunk. A kapott T-sejtben gazdag frakciót használtuk a további kísérletekben.

A B sejteket a T sejtek komplement mediált lízissel dúsítottuk, melyhez affinitás tisztított patkány anti-egér Thy-1.2 monoklonális ellenanyagot (ATCC, 30-H12) és komplementforrásként bébi nyúlsavót használtunk.

A szeparálás hatékonyságát áramlási citofluorimetriás mérés ellenőriztük.

A patkányok lépének eltávolítását követően a szervet mechanikailag roncsoltuk majd a vörösvérsejteket lizáltuk (ACK lízis puffer), így homogén lépsejt szuszpenziót kaptunk. 2-mercapthoethanollal és 10% FCS-al kiegészített DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) oldatban tartottuk.

Az állatkísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyezte (engedélyszám: 22.1/828/003/2007).

3.4.2. Humán sejtek izolálása

Vizsgálatainkhoz a Szent István Kórházból származó mandulákat, valamint az Országos Vérellátó Szolgálatól származó, egészséges donorok vérmintáit használtuk. Az emberi eredetű sejt- és szövetminták használata a nemzeti jogszabályok betartásával és az Etikai Bizottság engedélyével történt.

A mandulák mechanikai roncsolását követően, a mononukleáris sejteket Ficoll-Hypaque sűrűséggradiensben való centrifugálással nyertük ki. A B-sejtek dúsítása a T-sejtek eltávolításával történt. Az emberi T-sejtek 2-aminoetil-izothiourónium bromiddal (AET-tel) kezelt birkavörösvérsejtekkel rozettákat alkotnak, melyek a centrifugácso aljára ülepednek. A B-sejtek a Ficoll-oldat felszínén, a határrétegben gyűlnek össze, így könnyen elválaszthatók a T-sejtektől.

A $CD4^+$ T-sejteket – a vérkészítmények előállításánál során nyert „buffy coat”-ból – RosetteSep® Human $CD4^+$ T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) kittel izoláltuk, a gyártó protokollja szerint.

A granulocitákat egészséges donorok heparinnal alvadásgátolt véréből tisztítottuk: 30 perces, dextrános ülepítéssel a vörösvérsejtek nagy részét elválasztottuk a fehérvérsejtektől, majd a mononukleáris sejteket Ficoll-Hypaque sűrűséggradiens centrifugálással különítettük el.

A dendritikus sejteket a vérből izolált monocitákból differenciáltattuk Csomor és munkatársai leírása alapján (Csomor, Bajtay et al. 2007).

3.4.3. Sejtaktiválás

A patkány lépsejteket 5 µg/ml ConA, illetve 10 µg/ml LPS jelenlétében aktiváltuk.

Az emberi mandulából izolált B-sejtek stimulálásához 10 µg/ml kecske anti-humán IgG + IgM F(ab')₂ ellenanyagot használtunk.

A humán vérből izolált T-limfocitákat 24 lyukú sejtenyészítő lemezen immobilizált, 10 µg/ml anti-humán CD3 ellenanyaggal aktiváltuk.

3.4.4. Sejtfelszíni molekulák expressziójának vizsgálata áramlási citometriával

Vizsgálatainkhoz $2 \cdot 5 \cdot 10^5$ sejtet használtunk mintánként, melyeket FACS-pufferben történő mosást (8 perc, 1300 rpm) követően először az aspecifikus kötődések elkerülése érdekében FcR blokkolóval inkubáltunk (egér sejtek esetében K9.361 hibridóma felülszóból tisztított egér-FcγRII specifikus monoklonális ellenanyagot, humán sejtek esetében humán IgG-t használtunk). Ezt követően a sejtekhez hozzáadtuk a közvetlen jelölt, illetve jelöletlen monoklonális ellenanyagokat. Utóbbi esetén további inkubálás következett az első ellenanyagra-specifikus fluorokrómmal konjugált másododlagos ellenanyagokkal, vagy biotinált reagensek esetén avidin-fluorokróm konjugátummal.

A sejteket az egyes ellenanyagokkal 4 °C-on 20 percig jelöltük, az inkubálások között a mintákat FACS-pufferben mostuk (8 perc, 1300 rpm). Negatív kontrollként a monoklonális ellenanyagokkal azonos fajból származó, azonos izotípusú, azonosképpen jelölt indifferens ellenanyagokat használtunk.

Mintánként 10000 vagy 20000 sejt fluoreszcencia intenzitását mértük le FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton-Dickinson, San José, CA, USA). Az adatgyűjtés CellQuest Pro szoftver használatával, az eredmények kiértékelése FCS Express V3 szoftver (De Novo Software, Los Angeles, CA) segítségével történt.

3.4.5. A szénhidrát oldallánc vizsgálata: a sejtek enzimátikus kezelése

A sejtfelszíni szialsav oldalláncok eltávolítására a sejteket HEPES pufferben (HEBS), 50 mU/ml végkoncentrációjú *Vibrio cholerae* baktériumtörzsből származó neuraminidázal (szialidázal) inkubáltuk 30 percen keresztül 37 °C-on. Teljes médiumban történő mosás után a sejtfelszíni markerek expresszióját áramlási citometriával vizsgáltuk.

A papain kezelés eltávolítja a glikoproteinek hosszú túllógó extracelluláris doménjeit. Az emésztés során a sejteket Hank-féle pufferben 20 U/ml koncentrációjú papainnal kezeltük 20 percig, 37 °C-on, majd jéghideg FACS-pufferrel történő mosást követően áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a sejtfelszíni expressziós mintázat változását.

3.4.6. Az scFv konstrukció készítése

Reverz transzkripció

A GL7 ellenanyagot termelő hibridómasejtekből (GL7 klón) Tri-reagent (Sigma-Aldrich) reagenssel mRNS-t izoláltunk, melyről MMLV reverz transzkriptáz enzimmel (Stratagene, La Jolla, USA) cDNS-t szintetizáltattunk a nehéz lánc variábilis régiójáról a **VHFor** (TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC), a könnyű láncról a **RatCκ3** (CCA GTT AAA CTG TTC CG) primerekkel.

A V gének amplifikálása

A kapott cDNS-ről PCR technikával, Taq polimeráz enzim (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) segítségével szaporítottuk fel a könnyű és nehéz lánc variábilis doménjeit kódoló géneket. Ehhez a következő primereket használtuk :

A V_H génhez:

5' VH5 (GAG GTC CAA CTG GTG GAG AGC GG), illetve **VH5Combi** (AG GTG CAG CTG SWG GAG TC),

3' VHFor.

A V_L génhez:

5' VκBackNco (TCC ATG GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CC),

3' VκFor5 (CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC).

A kapott PCR termékeket T4 ligázsal (Boehringer Mannheim GmbH, Németország) EcoRV enzim (Fermentas, Ontario, Canada) által linearizált pBluescript II SK klónozó vektorba illetve *Escherichia coli* XL-1 Blue baktériumtörzsbe transzformáltuk. A pozitív klónokat kék-fehér szelekciót követő restrikciós analízissel választottuk ki.

A PCR reakció körülményei a következők voltak:

1. denaturálás	94 °C	60 sec
2. hibridizáció	54 °C	60 sec
3. polimerizáció	72 °C	30 sec
35 ciklus		

Overlap extension PCR

A könnyű és a nehéz láncot kódoló gének 3', illetve 5' végeire a következő primerek segítségével kapcsoló szekvenciát szintetizáltunk :

V_L gének esetén :

3' V_k3Link (AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TTT GAT TTC CAC CTT KGT SC),

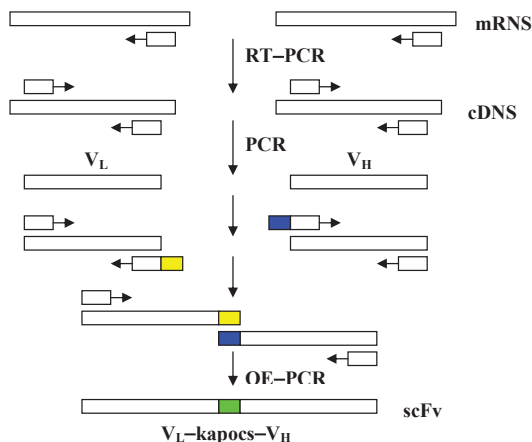
5' V_kGL7Nco (CC ATG GAG ATC ATG CTC ACC CAG CAA GC).

V_H gének esetén :

3' V_H3Not (TGC GGC CGC GGA GGA GAC GGT GAC CGG),

5' LinkVH5 (GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG CAG GTA CAG CTA GTG GAG).

A 5' V_kGL7Nco és a 3' V_H3Not primerek segítségével Nco I, Not I restrikciós enzimvágási helyeket építettünk be. A kapcsoló szekvenciákat (G₄S)₃ hordozó termékek fúziós-PCR során összekapcsolódtak, létrehozva a V_L-kapocs-V_H konstrukciót, melyet az előzőeknek megfelelően klónoztunk. A linker régió megfelelő flexibilitást biztosít az scFv stabil struktúrájának kialakulásához.

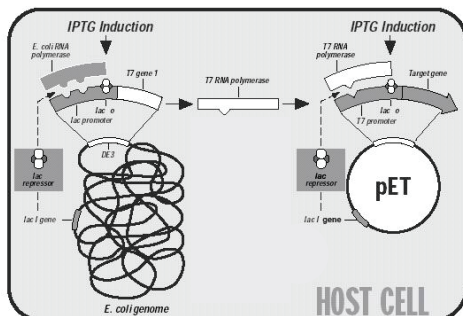


5. ábra. Az scFv-konstrukció készítése.

Az ellenanyagot termelő hibridóma sejtekből izolált RNS-ről reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, majd a V géneket amplifikáltuk. A gének 5' illetve 3' végére megfelelő primerek segítségével komplementer kapcsoló szekvenciákat szintetizáltunk (kék és sárga színnel jelölve), így a gének egy fúziós PCR során összekapcsolódtak, létrehozva a V_L-kapocs-V_H konstrukciót.

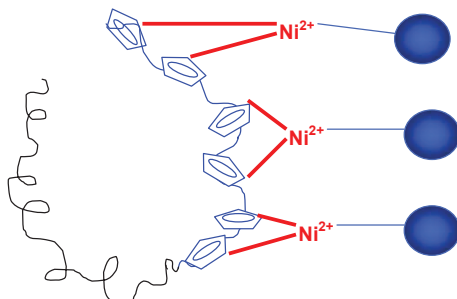
Fehérje expresszió, tisztítás és renaturáció

Az scFv fehérje tisztítása és renaturációja Kurucz és munkatársai leírása alapján történt (Kurucz, Titus et al. 1995). A fúziós terméket szekvencia-analízise után a C-terminális régióban egy hexahisztidin-, és egy myc-tag szekvenciát is tartalmazó, linearizált pET11c – T7 promóteren alapuló – expressziós vektorba ligálva *Escherichia coli* BL21 (DE3) expressziós baktériumtörzsbe transzformáltuk (6. ábra). Az induló sejt kultúrát egy éjszakán át növesztettük 100 µg/ml ampicillin-tartalmú LB médiumban, 37 °C-on. Másnap, egy 100x-os hígítás után, a fehérje expressziót 37 °C-on történő inkubálás során, 600 nm-en mért 0.7-0.8 optikai denzitás elérésekor 0.5 mM végkoncentrációjú IPTG adásával indukáltuk. További 3-4 órás rázatást követően a sejteket STE (10 ml/g baktérium pellet)+lizozim (10 mg/ml) oldatban lizáltuk jégen, 30 percig. Majd a lizátumot SDC hozzáadása után szonikáltuk. STE-ben történő mosást követően a szonikálást még 2-3× ismételtük. A kapott pelletet 2% SLS 50 mM TrisHCl pH 8.0 oldatban szolubilizáltuk, majd a fehérjéket 10 mM CuSO₄ jelenlétében éjszakán át oxidáltuk. E folyamat során alakulnak ki a megfelelő intramolekuláris diszulfid hidak. Másnap, a detergens (SLS) eltávolítása 50 mM TrisHCl pH 8.0, 6 M urea oldatban előkezelt QAE Sephadex anion cserélő gyantával (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) történt. A fehérjeoldat tisztítása és renaturációja Ni-NTA purifikációs rendszerrel történt (7. ábra). Ennek során a Ni-oszlophoz (Qiagen, Crawley, UK) kikötődött fehérjéket egy csökkenő urea-koncentrációjú (6-1 M) és növekvő NaCl-koncentrációjú (0-300 mM) mosó puffer-sorral mostuk. Mosási lépés (10 mM imidazol, 1% glicerol, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5) után az scFv-t egy imidazolt nagy koncentrációban tartalmazó mosó pufferrel (elúciós puffer: 250 mM imidazol, 1% glicerol, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5) eluáljuk az oszlopról. A tisztaságot és a termeltetés hatékonyságát a frakciók 280nm-en mért OD érték alapján számított koncentrációjának meghatározása után SDS-PAGE segítségével ellenőriztük



6. ábra. A T7 promóteres rendszer.

A T7 RNS polimeráz génje (T7 gén 1) a gazdasejt (*E. coli*) kromoszómájában található és a lac promóter kontrollja alatt áll. IPTG-vel indukálni lehet a T7 gén 1 transzkripcióját. A létrejött T7 RNS polimeráz felismeri a baktériumba transzformált pET vektor T7 promóterét és elindul a vektor DNS átírása. A termelődő fehérje N-terminális végére – a T7 terminátor régió előtt található His-Tag szakasz átírásával – egy hat hisztidinből álló szekvencia kerül.



7. ábra. Fehérje tisztítás Ni-NTA purifikációs rendszerrel.

A szilárd fázisú hordozóhoz kovalensen kapcsolt Ni^{2+} - ionok a fehérjelánc N-, vagy C- terminális végén található, hat hisztidinből álló túllógó véget szelektíven kötik. Így a kötődő komponens az elegy többi összetevőjétől könnyen elválasztható, majd a szilárd fázisról megfelelő módszerrel lemosható. A $6 \times$ His-tag és az Ni-NTA közötti kapcsolat konformáció független és a közöttük lévő kölcsönhatás enyhe elúciós feltételekkel megszüntethető. A $6 \times$ His-tag nem befolyásolja a tisztított fúziós fehérje struktúráját, funkcióját, de lehetővé teszi a fehérje immobilizációját fémfedett felszínen.

3.4.7. Az egyláncú ellenanyag kimutatása SDS-PAGE és western blot módszerrel

A Ni^{2+} -NTA oszlopról eluált fehérje frakciók tisztaságát és integritását western blotlal ellenőriztük. A fehérje mintákat 12%-os SDS-PAGE-ben futtattuk, majd vagy nitrocellulóz membránra blottoltuk vagy a gélen a fehérjéket Coomassie festéssel vizualizáltuk.

Blottolás után a membránon szabadon maradt helyeket 5% tejport tartalmazó TWB-0.05% TWEEN-oldattal blokkoltuk (1 óra, szobahőmérsékleten). Az scFv kimutatásához a membránt első lépésben a myc-tag szekvenciára specifikus 9E10 felülűző 1:10 hígításával inkubáltuk. A második antitest ezt felismerő HRP-vel konjugált kecske-anti egér IgG1 5000x-es oldata volt. A membránt az egyes ellenanyagokkal 1 órán át inkubáltuk, a lépések között 0.5% tejport tartalmazó TWB-0.05% TWEEN-oldattal mostuk. A blottot ECL el (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) detektáltuk.

3.4.8. Az egyláncú ellenanyag kötődésének vizsgálata áramlási citometriával

Vizsgálatainkhoz 2×10^5 2PK-3 sejtet használtunk mintánként, melyeket FACS-pufferben történő mosás (8 perc, 1300 rpm) után három lépésben jelöltünk a következők szerint:

1. ellenanyag: GL7 scFv
2. ellenanyag: biotin-konjugált c-myc-specifikus ellenanyag (9E10)
3. ellenanyag: FITC-konjugált anti-biotin

Az egyes ellenanyagokkal 20 percig, jégen inkubáltuk, a lépések között FACS pufferben mostuk a sejteket. Az aspecifikus kötődés gátlására K9.361 monoklonális ellenanyagot használtunk.

3.4.9. A kísérletek során használt egerek műtése és immunizálása

KÍSÉRLET I.

2-3 hónapos C57BL6/J nőstény egerek egy csoportja Avertin altatás mellett ovariektómián (OVX), más részük álműtéten (SHAM) esett át. Két héttel később mindkét csoportból az egerek egy részét T-sejtektől függő/TD (KLH-FITC), illetve T-sejtektől független/TI (dextrán-FITC) antigénnel immunizáltunk (**OVX+I**, **SHAM+I** csoportok). A kontroll csoportot PBS-sel, illetve CFA-val kezeltük (**OVX** és **SHAM** csoport).

KLH-FITC oltás esetén az egerek faroktőbe, szubkután (s.c.) 200 µg KLH-FITC-et kaptak. Az oltóanyag 200 µl 1 mg/ml KLH-FITC-et (KLH: Sigma-Aldrich, FITC: Invitrogen-Molecular Probes), 50 µl steril PBS-t és az antigén immunogenitásának fokozásához 250 µl komplett Freund adjuvánst (CFA; Sigma-Aldrich) tartalmazott. A kontroll csoportot CFA-val kezeltük.

Dextrán-FITC oltás esetén a kezelt csoport 200 µl 1 mg/ml, PBS-ben oldott dextrán-FITC-et (Fluka-Sigma) kapott intraperitoneálisan (i.p.). A kontroll csoportot PBS-sel kezeltük.

Az oltás utáni 6. napon az összes állatot túlaltattuk Avertinnel. Az állatok szérumból a haptén-specifikus ellenanyag szintet ELISA módszer segítségével, míg az állatok lépsejtjeiből az ellenanyag termelő plazmasejtek számát ELISPOT módszerrel határoztuk meg.

KÍSÉRLET II.

2-3 hónapos, Avertin altatás alatt ovariectomián átesett C57BL6/J nőstény egerek (n=28) közül 14 egér 1µg 17β-ösztradiolt (E2; Sigma-Aldrich; 0,1 ml etiloleát vivőanyagban oldva, szubkután/s.c.) a másik 14 egér csak vivőanyagot kapott az operációt követő 2., 7., 12. és 17. napon (**OVX+E2**, illetve **OVX** csoport).

Két héttel később 7 ösztrogén-kezelt, és 7 hordozóanyagot-kapott egeret immunizáltunk s.c. TD, illetve i.p. TI antigénnel (**OVX+E2+I**; **OVX+I**). Immunizálást követő 6. napon az összes állatot elaltattuk, majd a fent leírt módon jártunk el.

3.4.10. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Az egérszérumok FITC-ellenes ellenanyagszintjét ELISA módszerrel vizsgáltuk. 96 lyukú lemezekre (Corning, New York, WA, USA) PBS-ben hígított 10 µg/ml BSA-FITC-et kötöttünk ki egy éjszakán át, 4°C-on. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolásához 0,05% Tween20-PBS-ben oldott 1% nem zsíros tejport használtunk, mellyel a plate-eket 2 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szérumokat 1:50-ből induló 1/3-oló hígításban és 3 párhuzamosban mértük az egyes lyukakba. Szobahőmérsékleten történő 1 órás inkubálást követően HRP-val kapcsolt kecske anti-egér IgM és IgG ellenanyagok 2000x-es hígításával fedtük a lemezeket (PBS-TWEEN-ben). Az egyes inkubációs lépések között PBS-Tweennel mostuk a lemezeket. Az inkubálási idő (1 óra, 37 °C) letelte után a reakciót 3,30,5,50-tetrametil benzidin (TMB) (Dako, Glostrup, Denmark) szubsztráttal tettük

láthatóvá. A színreakciót 2N H₂SO₄ hozzáadásával állítottuk le, majd a kötődés mértékét fotometriásan mértük mikrolemez leolvasóval (ELISA Reader, Sanofi Pasteur, Diagnostics PR2100; λ = 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm). Az abszorbancia értékeket a 650 nm-en mért háttér abszorbancia levonása után és a három párhuzamos mérés átlagaként kaptuk meg.

3.4.11. ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSPOT)

A FITC-ellenes ellenanyagot termelő plazmasejtek számát ELISPOT módszerrel határoztuk meg. 96 lyukú nitrocellulóz lemezekre (Millipore Multiscreen HA plate, Billerica, MA, USA) steril, 10 ml PBS-ben hígított 10 mg/ml BSA-FITC-et kötöttünk ki egy éjszakán át, 4 °C-on. A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 5% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumot használtunk, mellyel 37 °C-on, ½ órán keresztül inkubáltuk a lemezeket. Ezután 5×10^6 , illetve 10^6 frissen izolált lépsejtszuszpenziót mértünk 3 párhuzamosban a lemez egyes lyukjaiba. 37 °C-on történő éjszakai inkubálást követően, HRP-konjugált kecske anti-egér IgM és IgG izotípusú ellenanyag 2000x-es hígításával fedtük a lemezeket. 1,5-2 óra, szobahőmérsékleten történő inkubálás után, végül a HRP enzim szubsztrátjával (3-Amino-9-ethylcarbazole/AEC; Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá a reakciót. Minden egyes lépés között háromszor mostuk a lemezeket 0,05% Tween20-PBS-el.

A kapott vörös plakkokat ImmunoScan ELISPOT reader segítségével számoltuk meg, az eredmények kiértékeléséhez az ImmunoScan szoftvert (C.T.L. Europe GmbH, Aalen, Germany) használtuk.

3.4.12. Egér IFN γ ELISA

Nőstény C57Bl/6 egerekből származó lépsejtek (5×10^6 sejt/ml) 100 μ l szuszpenzióját módosított, (L-Glutaminnal, Na-piruváttal, Penicillinnel, Streptomycinnel, 10% DCC-FCS-el, és mercaptoethanollal kiegészített) fenolvörös-mentes RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük 1, 10, illetve 100 nM 17 β -ösztrogén és/vagy 15 μ g/ml ConA jelenlétében 72 órán keresztül 37°C-os termosztátban. A sejtek által termelt IFN γ szintjének meghatározásához Quantikine ELISA kit-et használtunk a gyártó protokollja szerint (R&D Systems, Minneapolis, USA). Lyukanként 50 μ l felülúszót és 50 μ l „assay oldatot” adtunk.

2 órás, szobahőmérsékleten történő inkubációt követően konjugált anti-egér IFN γ ellenanyaggal fedtük a lemezeket. Az inkubálási idő (2 óra, szobahőmérséklet) letelte után a reakciót 100 μ l/lyuk „szubsztrát oldattal” detektáltuk. Az egyes inkubációs lépések között mosó oldattal mostuk a lemezeket.

A színreakció optikai denzitását 450 nm hullámhosszon, 620 nm-en mért referencia hullámhossz mellett mértük ELISA reader (Thermo Electron Corporation, Multiscan Ex) segítségével. Az abszorbancia értékeket a 650 nm-en mért háttér abszorbancia levonása után és a három párhuzamos mérés átlagaként kaptuk meg. A fehérje mennyiséget a standard görbéből kapott képlet alapján számoltuk.

3.4.13. Az ösztrogén fehérjefoszforilációra gyakorolt hatásának vizsgálata: sejttstimulálás, sejtlízis, SDS-PAGE és Western blot

A vizsgálatok során mintánként 5×10^6 sejtet használtunk. A sejteket az aktiválás előtt 1 órával szérummentes médiumban vettük fel, és 37 °C-on inkubáltuk 1 nM, 10 nM, 100 nM 17 β -ösztradiollal. Kontrollként az ösztrogénnek megfelelő mennyiségű 100%-os etanollal, a T-sejteket 50 μ g/ml anti-egér CD3 ellenanyaggal, a B-sejteket 6 μ g/ml anti-egér IgM F(ab') $_2$ ellenanyaggal 5 percig kezeltük. Az aktivációs idő lejártával a sejteket lecentrifugáltuk (14000 rpm, 20 másodperc), a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejtplaneteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk.

Ezt követően a sejteket 100 μ l lízis pufferben 30 percen keresztül inkubáltuk jégen időnként erős szuszpendálást alkalmazva, majd a mintákat 15000 \times g sebességgel 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszókból 80-80 μ l-t 20-20 μ l ötszörös töménységű SDS-PAGE redukáló mintapufferrel 5 percig 95 °C-on denaturáltuk. Az elkészített mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélben futtattuk 120 V feszültség mellett, Bio-Rad márkájú Mini-PROTEAN 3 Cell készülékben (Bio-Rad Hungary, Budapest). Az elektroforézis során szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blotoltuk 200 mA konstans áramerősségen, 90 percig. A kiválasztott célfehérjék kimutatásához a membránokat adott specificitású elsődleges ellenanyaggal, illetve HRP-vel konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, majd Super Signal West Pico kemilumineszcens reagenssel (Thermo Scientific) kezeltük, végül a kemilumineszcens jelet röntgenfilmen rögzítettük (Kodak Hungary, Budapest). A mennyiségi analízist denzitometriával végeztük (Image J program, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA).

3.4.14. NF κ B aktiváció mérése

6-8 hetes C57Bl/6 nőstény egerek lép B-sejtjeit negatív szelekción alapuló EasySep Mouse B Cell Enrichment Kittel (StemCell Technologies, város, USA) szeparáltuk a gyártó protokollja alapján. Majd a B-sejteket 60 percig kezeltük 17 β -ösztradiollal, valamint kontrollként anti-egér IgM F(ab')₂ ellenanyaggal, illetve az ösztrogénnek megfelelő mennyiségű 100%-os etanollal. Az aktivációt jéghideg PBS-sel állítottuk le. 2x10⁷ sejtet szuszpendáltunk az A pufferben. 20 perc jégen történő inkubálást követően a mintákat cukorgrádiensen (30.8% cukor (w/v) az A pufferben oldva) centrifugáltuk (4 °C, 8000g, 10 perc). A felülúszót eltávolítottuk, majd a pelletet a C pufferben homogenizáltuk és 30 perces jégen történő inkubálás után centrifugálással ülepítettük. A felülúszóhoz azonos térfogatú D puffert adtunk, majd a mintákat SDS-poliakrilamid gélben futtattuk és nitrocellulóz membránra blottoltuk. Az NF κ B fehérjék magfrakcióból történő kimutatásához a membránt különböző Rel fehérjékre specifikus ellenanyagokkal, továbbá HRP-vel konjugált anti-nyúl ellenanyagokkal inkubáltuk.

3.4.15. NF κ B transzlokáció vizsgálata konfokális mikroszkópiával

NF κ B festés során a sejteket aceton és metanol jéghideg oldatainak 1:1 arányú keverékével fixáltuk és permeabilizáltuk 10 percig, majd 1% BSA tartalmú PBS oldattal rehidratáltuk 10 percig. A sejteket szobahőmérsékleten, 45 percig inkubáltuk az anti-p65 NF κ B ellenanyaggal, másodlagos ellenanyagként Alexa-488 illetve -647-tel konjugált anti-nyúl IgG (H+L) reagenst használtunk. A sejtmagok festéséhez DNS-specifikus DRAQ5 festéket használtunk 2.5 μ M végkoncentrációban. A fluoreszcens mikroszkópiás felvételek egy Ar-ion lézerrel (488 nm), egy zöld (543 nm) és egy vörös (632 nm) He-Ne lézerrel felszerelt Olympus IX81 FLUOView 500 lézerpasztázó konfokális mikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Germany) készültek. A fluoreszcens és DIC (differenciál interferencia kontraszt) képek 512x512 pixel képfelbontásban, és 60x olajimmerziós objektívvel (N.A.: 1,41) kerültek felvételre. A képfeldolgozást és kiértékelést a "Wright Cell Imaging Facility" weboldaláról elérhető Image J szoftverrel és kolokalizációs segédprogramjaival végeztük.

3.4.16. Statisztikai módszerek

Az *in vivo* eredményeket az átlag \pm SEM feltüntetésével ábrázoltuk. A statisztikai szignifikancia meghatározásához a STATISTICA 7.0 programot (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) használtuk. A kísérleti csoportok közötti különbségek meghatározására négy kísérleti csoport esetén két utas ANOVA-t és Neuman-Keuls post hoc tesztet, alkalmaztunk. A szignifikancia határát $p < 0,05$ -nél húztuk meg, és ezt a diagram megfelelő oszlopában a (p) értékek feltüntetésével ábrázoltuk.

4. EREDMÉNYEK

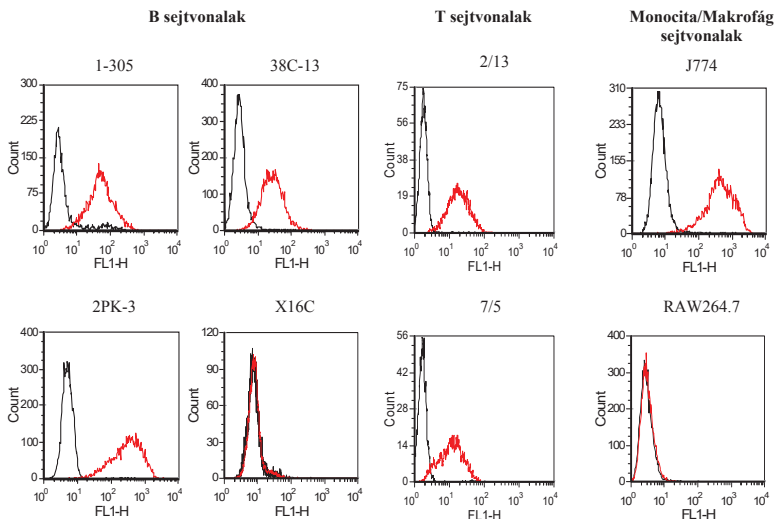
4.1. A GL7 epitóp szerkezete és differenciált expressziója

4.1.1. A GL7 epitóp expressziója humán és egér mieloid és limfoid sejtvonalakon

Korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy a GL7 epitóp egérben az immunsejtek közül csak a limfoid eredű sejteken jelenik meg. Makrofágok, granulociták és dendritikus sejtek sem expresszálják az epitópot *in vivo* és *in vitro* aktivációt követően sem. A B-limfociták közül a másodlagos nyirokszervekben a germinális centrum B-sejtekre jellemző a GL7 pozitivitás, a marginális zóna nem festődik és a peritoneális CD5⁺ IgM⁺ B1-sejteken sem lehet detektálni. Aktivált fenotípusú illetve tumorossá váló sejtek gyakran mutatnak az azonos eredetű egészséges sejtektől eltérő sejtfelszíni mintázatot különös tekintettel glikozilációs szempontból. Ezért megvizsgáltuk a GL7 kifejeződését különböző eredetű egér sejtvonalakon.

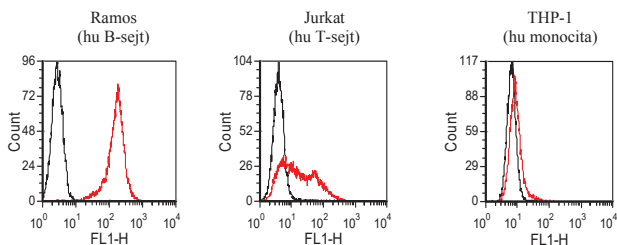
A vizsgálataink során használt egér sejtvonalak közül a pre-B (1-305), az éretlen-B (38C-13) és az aktivált, érett B-blasztok (LK-35, M12-4.1, 2PK-3, TA-3) magasan expresszálták a GL7 epitópot, míg a lép marginális zóna eredetű, érett B-sejtvonal (X16C) GL7 negatívnak bizonyult. A CD19⁺ CD21⁺ monocita/makrofág típusú sejtvonalak (J774A.1, P338D1) felszínén kimutatható a GL7, ellentétben a peritoneális eredetű, CD19⁺ CD21⁺ makrofágokkal (WEHI-3, RAW264.7), masztocitóma és fibroblasztoid sejtvonalakkal (P815, L929, WEHI-164). Az általunk vizsgált Th hibridóma sejtek különböző mértékben, de GL7 pozitívnak bizonyultak (8. ábra).

A GL7 megjelenés vizsgálatát a későbbiekben kiterjesztettük humán sejtvonalakra is. A különböző eredetű, így éretlen B- (Ramos, SKW), érett B- (Raji, HT-58, Bjab, BL41, Daudi), T-sejt leukémia (Jurkat) sejtek GL7⁺-nak bizonyultak, míg a monocita leukémia (THP-1) sejtek nem expresszálták az epitópot (9. ábra) Ezeket a méréseket az adatgyűjtésen kívül előkísérletnek is tekintettük. Ennek alapján választottuk ki a megfelelő sejteket a további tervezett vizsgálatokhoz. A 8. és 9. ábrán néhány kiválasztott sejtvonal esetében mutatjuk be a GL7 ellenanyag kötődését.



8. ábra. GL7 expresszió különböző egér sejtvonalakon.

Különböző egér B-, T- és monocita-makrofág sejtvonalakat GL7 ellenanyaggal való jelölést követően áramlási fluorimetria segítségével analizáltunk. Fekete: izotípus kontroll; piros: GL7 kötődés.

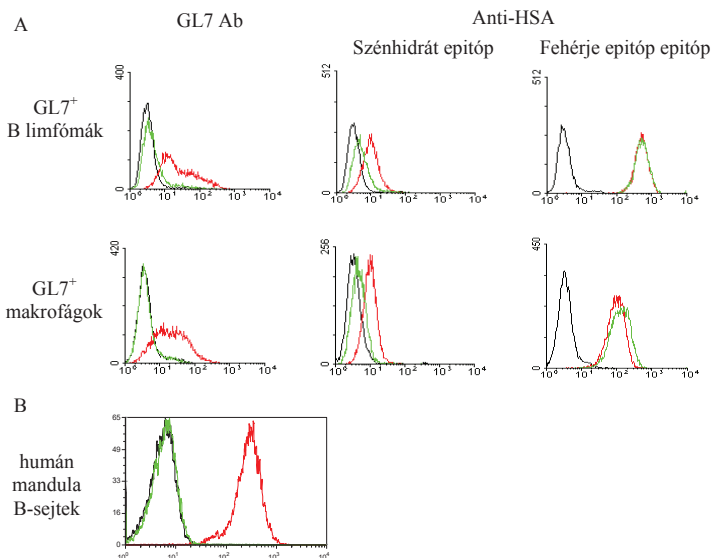


9. ábra. GL7 expresszió különböző humán sejtvonalakon.

Különböző humán B-, T- és monocita-makrofág sejtvonalakat GL7 ellenanyaggal való jelölést követően áramlási fluorimetria segítségével analizáltunk. Fekete: izotípus kontroll; piros: GL7 kötődés.

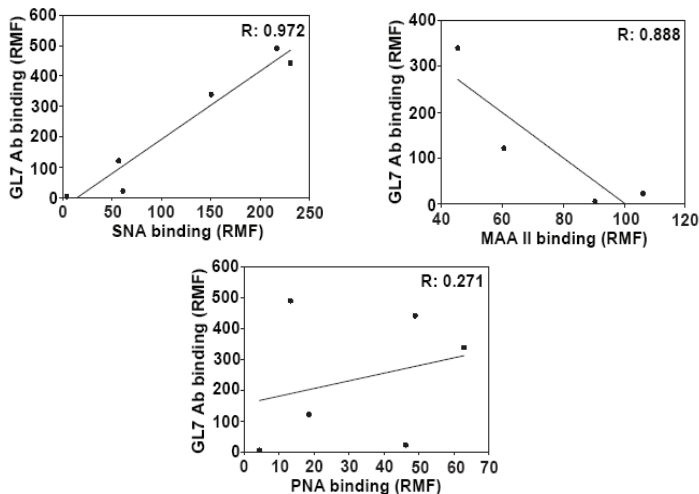
4.1.2. A GL7 ellenanyag egy szialidáz érzékeny epitópot ismer fel

Az epitópot felismerő ellenanyag IgM izotípusa, valamint tunikamicinnel végzett korábbi vizsgálatok eredménye már valószínűsítette, hogy a GL7 epitóp szénhidrát motívumot tartalmaz. Ezért az epitóp kémiai természetének kiderítéséhez a sejteket neuraminidáz (szialidáz), enzimmel kezeltük. Először néhány eger B-limfóma sejtet vizsgáltunk. Mivel ezeken a sejteken a GL7 és a CD24 megjelenése között korrelációt találtunk, továbbá a CD24 esetében hozzáférhető egy szénhidrát epitópot felismerő patkány IgM és egy fehérje epitópot felismerő patkány IgG monoklonális ellenanyag, ezekben a kísérletekben kontrollként a GL7 mellett, a CD24 ezen két epitópjának enzim érzékenységét is vizsgáltuk. A szialidázzal (sia emésztés) történő emésztés valamennyi vizsgált sejttípus esetében teljesen eltüntette a GL7 ellenanyag által felismert epitópot. Hasonlóképpen nem kötődött a kezelt sejtekhez a CD24 specifikus J11d2 ellenanyag sem, ugyanakkor a fehérje epitópot felismerő M1/69 IgG továbbra is jelölte a sejteket (10. A ábra). Aktivált eger lépsejteken és T-sejt hibridómákon hasonló eredményt kaptunk.



10. ábra. Szialidáz kezelés hatása a GL7 epitópot felismerő ellenanyag kötődésére. Eger sejtvonalakon (A) és humán mandulából izolált B-sejteken vizsgáltuk a GL7 ellenanyag kötődését szialidáz kezelést követően, áramlási citometriával. (kontroll: fekete; GL7 Ab kötődése szialidáz kezelés előtt: piros/után: zöld)

Ezek a kísérletek már jelezték, hogy a GL7 ellenanyag által felismert építőp kialakításában szíalsav oldalláncoknak szerepe van (folyóiratban megjelent konferencia absztrakt: Ádori, M., Balogh, A., Weiszhar, Zs., Prechl, J., Matkó, J., László, G.: Studies on cell specific expression, structure and membrane localization of a late lymphoid activation antigen Ly77 (GL7). The FEBS Journal, 2005). Később vizsgáltuk a GL7 építőpot felismerő ellenanyag és három eltérő szénhidrátot felismerő növényi lektin, a galaktozil- β 1-3-N-acetilgalaktózamin kötő PNA, az α 2-3- és az α 2-6-sziálsavakat kötő MAA II illetve SNA kötődését különböző egér és humán eredetű sejtekhez (11. ábra). A GL7 ellenanyag kötődése pozitív korrelációt mutatott az SNA, míg negatív korrelációt az MAA II lektin kötődésével. Ezek az eredmények az α 2-6-sziálsavak építőpot kialakító szerepére utalnak. A PNA esetében semmilyen összefüggés nem volt kimutatható.



11. ábra. Korreláció a GL7 expresszió és lektinek sejtfelszíni kötődése között.

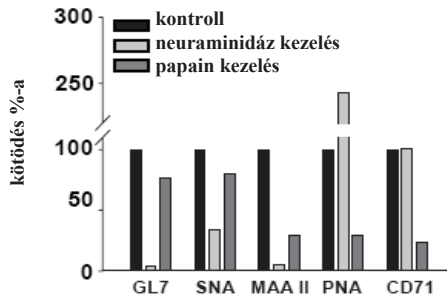
A GL7 Ab, az SNA, MAA II és a PNA lektinek kötődését hat különböző humán sejttípus esetében vizsgáltuk (primer humán T- és B-limfociták, Ramos és Daudi humán B-, Jurkat T- és THP-1 monocita sejtvonalak). Az adatokra lineáris regresszióval egyenest illesztettünk (R: regressziós egyenlet).

Nemrégiben egy japán munkacsoport a Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc szénhidrát oldalláncot azonosította a GL7 ellenanyag által felismert epitópként. Továbbra is kérdés maradt azonban, hogy milyen sejtfelszíni molekulán (molekulákon) jelenik meg az epitóp. A kísérletek során a szialidáz mellett a fehérjeemésztő papainnal is kezeltük a sejteket. A 2. táblázat adatai mutatják, hogy a papain kezelés az SNA lektinnel detektált szialsav oldalláncok mennyiségét a és a GL7 ellenanyag kötődését is csak részlegesen csökkentette ugyanakkor a CD24 molekula, szintén szialsav természetű epitópját felismerő J11d2 ellenanyag kötődése a fehérje epitópot felismerő ellenanyagéhoz hasonlóan nagy mértékben lecsökkent. Hasonló eredményre jutottunk primer humán mandula sejtek vizsgálatával is (10. B ábra, 12. ábra). Ezekből az eredményekből az feltételezhető, hogy a Neu5Ac B-limfocitákon nem csak egy papain szenzitív fehérje lánchoz, vagy nem csak egy papain szenzitív molekulához, esetleg nem csak membrán fehérjé(k)hez kötődik.

Relatív Átlagos Fluoreszcencia (RMF)						
Vizsgált marker	2PK-3 egér B-limfóma			7/5 egér TH hibridóma		
	kezeletlen	papainnal kezelt	neuraminidázal kezelt	kezeletlen	papainnal kezelt	neuraminidázal kezelt
SNA	16,7	10,3	5,7	11,1	9,3	2,6
GL7	216,7	133,5	14,8	255,6	164,8	1
CD24 / J11d2	25,5	5,6	1,1	-	-	-
CD24 / M1/69	22,3	4,1	23,3	-	-	-

2. táblázat. Egér limfoid sejtvonalak papainnal és neuraminidázal történő kezelésének hatása az SNA lektin, a GL7 és a CD24-et fehérje vagy szénhidrát epitópját felismerő ellenanyagok kötődésére.

A táblázatban feltüntetett értékek az ellenanyag/lektin és az izotípus kontroll kötődéséből számolt hányados: relatív átlag fluoreszcencia.

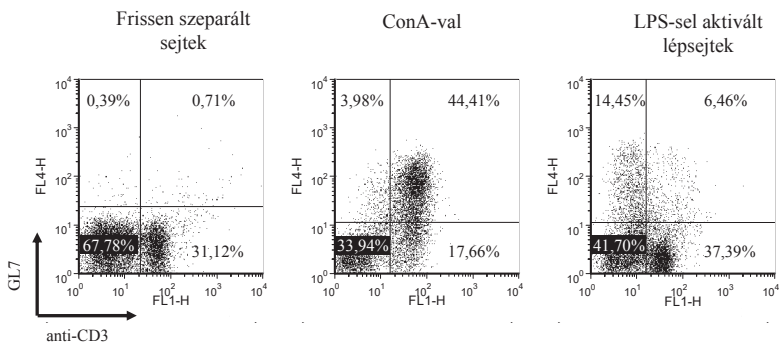


12. ábra. Humán primer B-sejtek neuraminidázzal történő kezelésének hatása az SNA, MAA II és PNA lektin, a GL7 és a CD71-et felismerő ellenanyagok kötődésére.

Humán mandula B-sejteket kezeltünk *Vibrio cholerae*-ből származó neuraminidáz, valamint *Papaya latex*-ből származó papain enzimekkel és áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk a lektinek és ellenanyagok kötődését. A kontroll (kezeletlen) minták RMF értékeit vettük 100%-nak.

4.1.3. A GL7 epitóp *in vitro* aktivációt követően patkány lépsejteken is kimutatható

Arravaló tekintettel, hogy a GL7 epitópot az emlősökben általánosan előforduló Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc szénhidrát oldallánccal azonosították felmerült a kérdés, hogy a patkány eredetű ellenanyag vajon felismeri-e a patkányban expresszáldó molekulát, és ha igen, ez az egerekben leírtakhoz hasonló megjelenést mutat-e? Frissen szeparált egér lépsejteken a GL7 nem fejeződik ki, csak az LPS-sel vagy ConA-val történő aktivációt követően 48-60 órával lehet detektálni a B-, illetve T-blasztokon. A GL7 megjelenése a patkány lépsejtek esetében is az egér limfocitákéhoz hasonló képet mutatott, vagyis csak aktivációt követően legalább 48 órával, de akkor egyértelműen kifejeződött a T- és B-lépsejteken (13. ábra).

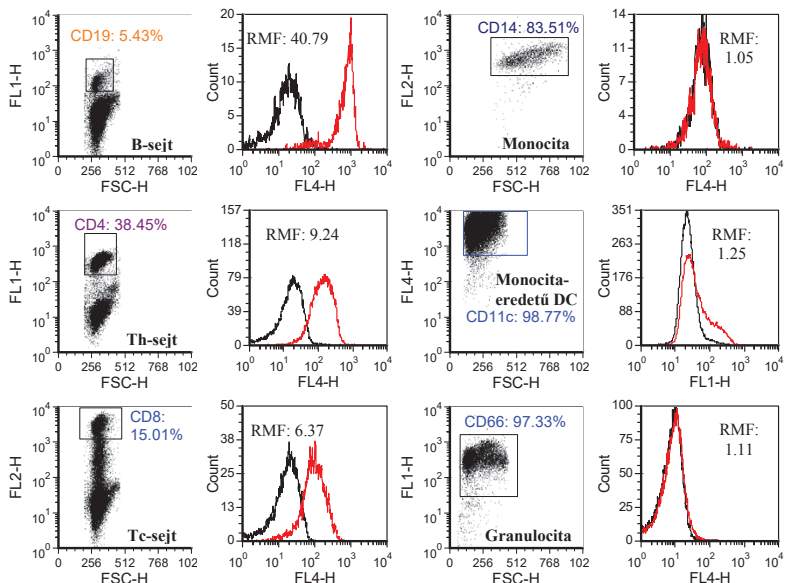


13. ábra. GL7 expresszió aktivált és kontroll patkány limfocitákon.

A GL7 epitóp expresszió vizsgálata áramlási citofluorimetriával frissen szeparált patkány lépsejteken, illetve aktivált T- és B-limfocitákon. A reprezentatív dot plot-ok három független mérés eredményét mutatják.

4.1.4. A GL7 emberi perifériás limfocitákon konstitutív módon kifejeződik

Néhány éve vált ismertté, hogy az aktiváció függvényében inaktiválódó CMAH enzim, amely az egérben felelős lehet a Neu5Ac Neu5Gc formába történő konvertálásáért és így a GL7 epitóp differenciált megjelenéséért, egy az emberré válás során bekövetkezett mutáció következtében emberben nem működik. Ezért megvizsgáltuk, hogy a primer humán immunsejtek közül melyek expresszálják a GL7 antigént. Buffy coat-ból izolált PBMC-ken és granulocitákon, valamint monocitákból differenciáltott DC-ken vizsgáltuk a GL7 megjelenését áramlási citofluorimetria segítségével. A humán véresejtek közül csak a B- és T-limfociták bizonyultak GL7⁺-nak (14. ábra), míg a monociták, a granulociták, de még az érett DC-k sem expresszálták a GL7 epitópot (14. ábra). Mindezen túl, a B-sejteken körülbelül 4-szer több antigén volt detektálható, mint a T-sejteken (14. ábra). Tehát a GL7 epitóp a humán immunsejteken is differenciáltan jelenik meg.



14. ábra. A GL7 konstitutíván expresszálódik humán primer limfocitákon.

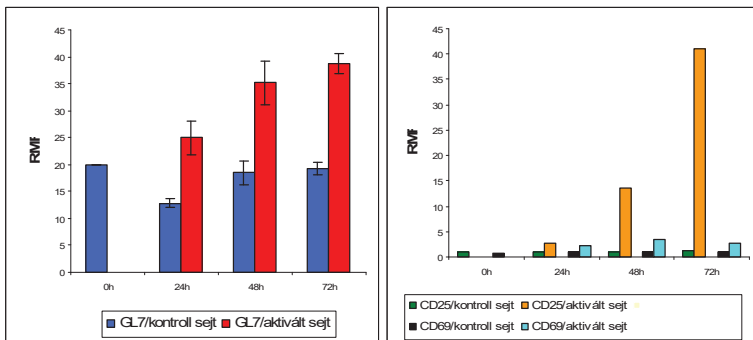
Különböző vérsajtó populációkat jelöltünk GL7, valamint sejttípus specifikus ellenanyagokkal. Az áramlási citofluorimetriás hisztogramok a limfoid, és a mieloid sejteket mutatják. A relatív átlag fluoreszcencia (RMF) értékeket a GL7 ellenanyag kötődéséből (piros) kapott átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) és az izotípus kontroll (fekete) MFI értékek hányadosaként számoltuk.

4.1.5. Aktiváció hatására humán T- és B-limfocitákon eltérően változik a GL7 expresszió

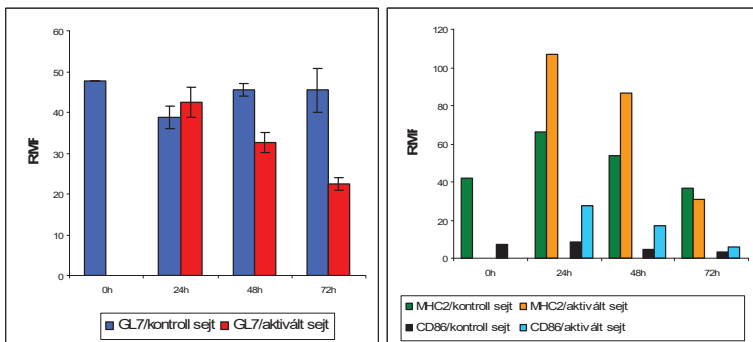
Számos irodalmi adat igazolja, hogy a glikoziláció mértéke függ a sejttípus differenciáltságától és aktivációs állapotától, továbbá egérben és emberben is ismertek α 2-6-sziálsavak felismerő sziglek ezért megvizsgáltuk GL7 epitóp expressziójának változását a limfociták *in vitro* aktivációja során. CD3-mal, illetve anti-IgM+G ellenanyaggal aktivált humán vérből szeparált T- és mandulából kinyert B-limfociták aktivációját követtük olyan módon, hogy a GL7 mellett ismert aktivációs markerek expresszióját is detektáltuk. Aktivált T-limfocitákon a CD25 és a CD69 mellett a GL7 expresszió is jelentősen megnőtt. Ugyanakkor B-sejteken az MHC II és a CD86

megnövekedett expressziója mellett a GL7 epitóp kifejeződése jól láthatóan csökkent. (15. ábra). Ezen eredmények azt mutatják, hogy bár a humán limfociták konstitutívan expresszálják a GL7 epitópot, az epitóp sejtfelszíni mennyisége sejttípus és aktivációfüggő.

A



B



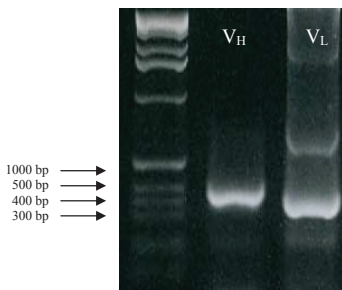
15. ábra. A GL7 epitóp expressziója aktiváció hatására kétirányúan változik T-, illetve B-sejteken.

Humán perifériás vér T-sejteket anti-CD3 ellenanyaggal aktiváltunk, majd áramlási citofluorimetriával néztük az aktiválatlan és az aktivált sejtek GL7 epitóp expresszióját (A, bal diagram), CD25 és CD69 aktivációs markerek mellett (A, jobb diagram). Humán mandulából izolált B-sejteket anti-IgM+G ellenanyaggal aktiváltunk, majd analizáltuk a GL7 epitóp expresszióját (B, bal diagram), CD86, MHC II aktivációs markerek expressziójának változása mellett (B, jobb diagram). A diagrammok három párhuzamos mérés RMF értékeit \pm SD ábrázolják.

4.1.6. A GL7 epitópot felismerő egyláncú ellenanyag létrehozása

A GL7 epitópot felismerő ellenanyag IgM izotípusú, mely nagy a mérete (900 kDa), kereszt kötő képessége, Fc-függő funkciói miatt az általunk tervezett kísérletek egy részében – különös tekintettel a GL7 epitópot hordó molekula funkcionális szerepének tisztázását célzó *in vitro* és *in vivo* rendszerekre – natív formájában nem használható. Munkacsoportunk korábban sikertelenül próbálta az ellenanyagot termelő hibridómasejtet izotípusváltásra készíteni. Az ellenanyagból enzimes emésztéssel nyerhető Fab, illetve F(ab')₂ fragmentumok kinyerése csak nagyon kis hatékonysággal bizonyult kivitelezhetőnek. Ezért az antitestnek csak variábilis doménjeit tartalmazó rekombináns ellenanyag (scFv) előállítása mellett döntöttünk. Az scFv-k antigén iránti specificitása és affinitása általában azonos az eredeti ellenanyagéval, az aviditásuk azonban kisebb ezért alkalmazásuk számos módszerben jelenthet előnyt.

A konstrukció készítésének első lépéseként a GL7-specifikus ellenanyagot termelő hibridóma sejtekből (2PK-3) mRNS-t izoláltunk, melyről reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltattunk. A továbbiakban a cDNS-ről PCR technikával, megfelelő primerek segítségével felszaporítottuk a könnyű és a nehéz lánc variábilis doménjét kódoló géneket. A reakció termékeit molsúlymarker mellett 1.5%-os agaróz gélben futtattuk (16. ábra).

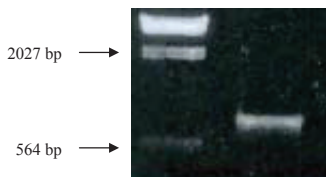


16. ábra A könnyű és nehéz láncok DNS-ének gél-elektroforetikus képe.

Az RT-PCR során kapott cDNS-ről megfelelő primerek segítségével felszaporítottuk a könnyű (V_L) és a nehéz (V_H) lánc variábilis doménjét kódoló géneket. A reakció termékeit molsúlymarker mellett 1.5%-os agaróz TAE gélben futtattuk

A könnyű és nehéz láncot kódoló gének 5' és 3' végeire primerek segítségével kapcsoló szekvenciát szintetizáltattunk, így azok egy fúziós PCR során összekapcsolódtak, létrehozva a V_L-kapocs-V_H konstrukciót (17. ábra), melyet módosított pET11c expressziós vektorba klónoztunk. Ez a vektor a szekvenciájának C-terminális oldalán további 2 régiót

tartalmaz: egy hexahisztidin szekvenciát, mely a hatékony tisztításért felelős és egy 9 aminosavból álló, c-myc eredetű peptidet, mely a fehérje detektálását teszi lehetővé.



17. ábra. Tisztított fúziós PCR termék. 1,5%-os alacsony olvadáspontú (LMP) gélből izolált fúziós-PCR terméket fenolos extrahálás, majd alkoholos kicsaoás után 1.5%-os agaróz gélben, molsúlymarker mellett futtattunk. A termék kb. 780 bp nagyságúnak bizonyult.

Az egyláncú ellenanyag nukleinsav szekvencia analizisét az on-line elérhető szekvencia analizáló program segítségével (The Sequence Manipulation Suite) végeztük. A kapott V_L és V_H gének vázszekvenciáját Kabat szekvencia adatbázis szerint azonosítottuk, és besoroltuk a Mouse K Light Chains V. (könnyű lánc), illetve a Mouse Heavy Chains I. B (nehéz lánc) csoportokba. A vázszekvenciákban azonosítottuk az esszenciális aminosavakat és az intramolekuláris diszulfid hidak kialakításában szerepet játszó ciszteineket a könnyű lánc 24. és 94., valamint a nehéz lánc 22. és 95.pozíciójában. (18. ábra). Megtaláltuk a CDR1-3 régiókat, így a klónozott szekvencia megfeleltethető a patkány immunglobulin molekula könnyű és nehéz láncának variábilis régiójával.

```

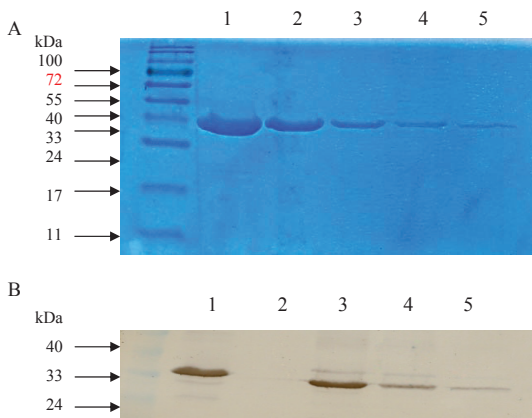
1 M E I M L T Q Q A E S L W I S P G E R V
1 ATGGAGATCATGTCTACCCAGCAAGCAGAGTCCCTTTGGATTCTCCAGGAGAGAGAGTC
21 S I T C R A S Q S L L Y T D G L H Y L S
61 TCCATACCTTGCAGGGCCAGTCAGAGCCTCTCTACACAGATGGAAAGCACTACCTATCT
41 W Y Q Q R P G Q T T L A L I Y H A S V A
121 TGGTACCAGCAGAGACAAGGACAACTACCAAGGCCCTCATTTACACGCTTCAGTCAGG
61 T D G V P T R F I G S G S G T E F T L S
181 ACTGATGGAGTCCCCACCAAGTTTCATTGGCAGCGGATCTGGGACAGAATTTACCTTTCT
81 I E H V Q P E D F A I Y Y C L Q T L K S
241 ATTGAACATGTCCAGCCTGAGGACTTTGCAATTATATTGCTTCAAACACTGAAGAGC
101 P Y T F G A G T K V E I K G G G G S G G
301 CCCTACACCTTTGGAGCTGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGA
121 G G S G G G G S Q V Q L V E S G P G L V
361 GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGTACAGCTAGTGGAGTCAGGACTGGTCTGGTG
141 Q P S Q Q T L S L T C T V S G F S L T S Y
421 CAGCCTCACAGACTTTGTCTCTACCTGCACTGTCTCTGGTTCTCACTAACCAGCTAT
161 H V S W V R Q P P G K G L E W M G V I W
481 CATGTAAAGCTGGGTTGCCAGCCTCCAGGGAAGGTCTGGAGTGGATGGAGTAATATGG
181 T G G S T A Y N S L L K S R L S I S R D
541 ACTGGTGAAGCACAGCATATAATTCACTTCTCAAATCCCGACTGAGCATCAGACGGAC
201 T S K S Q V F L K M N S L Q T E D T A T
601 ACCTCCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGAAGACACAGCCACT
221 Y Y C A R A D W E T L F D Y V G Q G T P
661 TACTAGTGGCAGAGCGGACTGGGAGACCCTCTTTGATTACTGGGGCCAAGGGACCCCG
241 V T V S S A A A E Q K L I S E E D L N H
721 GTCACCGTCTCTCCGCGGCCGCAAGAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTGAATCAC
261 H H H H H A M B
781 CACCACCACCACCTAG

```

18. ábra. A GL7 scFv konstrukció nukleinsav- és aminosavszekvenciája.

A fúziós-PCR reakcióban létrejött V_L -kapocs- V_H termék szekvencia analízise során stopkodon és frameshift mentes szekvenciát kaptunk. Megtalálhatók a láncban belüli, S-S hidakat kialakító ciszteinek (□), illetve a nehéz lánc 3' végén a Myc-tag és a 6 hisztidinből álló His-tag szekvencia(□), amelyeknek az expresszálódo fehérje kimutatásában, illetve fémaffinitás kromatográfiával történő tisztításában lesz szerepük. A □ a linker régiót, a □ CDR szekvenciákat jelöli.

A következő lépésben a konstrukciót tartalmazó pET vektort *E. coli* BL21 (DE3) expressziós baktériumtörzsbe transzformáltuk. A fehérje expressziót – a megfelelő OD₆₀₀ elérése után – IPTG adásával indukáltuk. A sejteket lizáltuk, majd az egyes lizátumokból 12%-os akrilamid gélben különböző mennyiségű mintákat futtattunk. A gélét Coomassie blue festékkel festettük vagy western blot módszerrel detektáltuk (19 A, B. ábra). A vártnak megfelelően 35 kDa molekulásúlyú fehérjét mutattunk ki.



19. ábra. A GL7 scFv konstrukció kimutatása SDS-PAGE és western blot módszerrel.

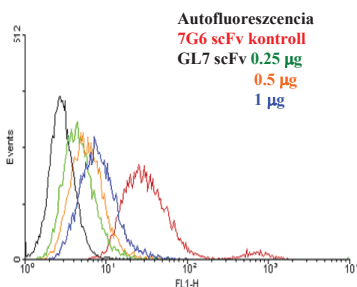
A GL7 scFv konstrukciót Ni-NTA oszlopon történő tisztítás után SDS-PAGE és Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá (A), vagy western blot segítségével detektáltuk (B). Az scFv konstrukciót c-myc specifikus 9E10, majd HRP-konjugált kecske anti-egér IgG-specifikus másodlagos ellenanyagokkal hívtuk elő.

A: 1-5 → 2.-6. GL7 scFv fehérje frakciók

B: 1 → 7G6 scFv pozitív kontroll

2-5 → 1.-4. GL7 scFv fehérje frakciók

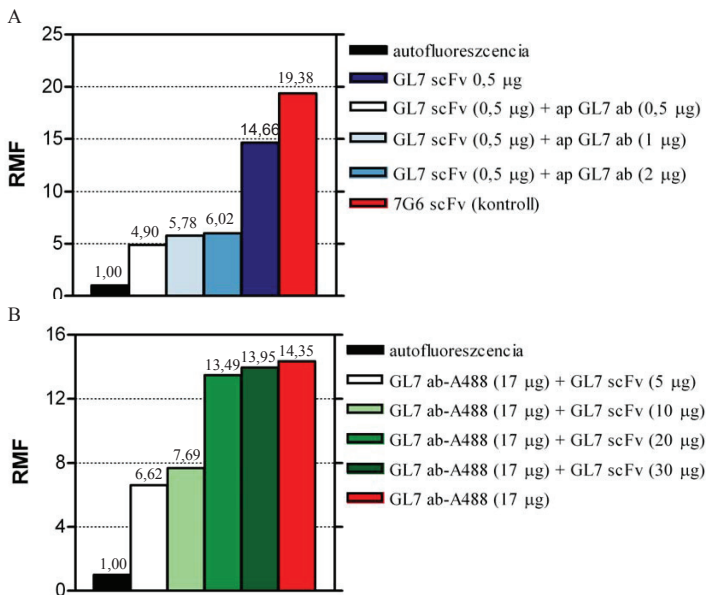
A GL7 egyláncú konstrukció specificitását áramlási citometria segítségével vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk létrehozott konstrukció specifikusan és dózis függően kötődik GL7⁺ sejtekhez (20. ábra).



20. ábra. A létrehozott egyláncú ellenanyag kötődésének vizsgálata FACS analízissel.

Háromlépéses jelölés első lépésében a vizsgálathoz felhasznált 2PK-3 B-limfóma sejteket a rekombináns ellenanyag felező hígításával inkubáltuk. A negyedik lépésben FITC-konjugált avidint használtunk, melynek fluoreszcencia intenzitását FL1-ben mértük. Pozitív kontrollnak a CR1/2-specifikus 7G6 scFv-t használtuk.

A 21. ábra diagrammjain jól átható, hogy a két ellenanyag kölcsönösen képes gátolni egymás kötődését. A teljes ellenanyag nagyobb méretének, és pentamer szerkezetéből adódó nagyobb aviditásának köszönhetően jobban le tudta szorítani az egyláncú ellenanyagot.



21. ábra. Az egyláncú és az eredeti, IgM izotípusú ellenanyag közti kompetíció vizsgálata áramlási citometriával.

A sejteket tisztított teljes GL7 (A) vagy GL7 egyláncú Ab (B) különböző hígításaival inkubáltuk. Majd azonos mennyiségű scFv konstrukcióval (A) vagy A488-cal jelölt GL7 ellenanyaggal (B) további 20 perces inkubálást követően a kapott jelet FL1-ben mértük. A GL7 vagy a kontrollként használt 7G6 egyláncú detektálásához. 9E10-biotint és avidin-FITC-et használtunk.

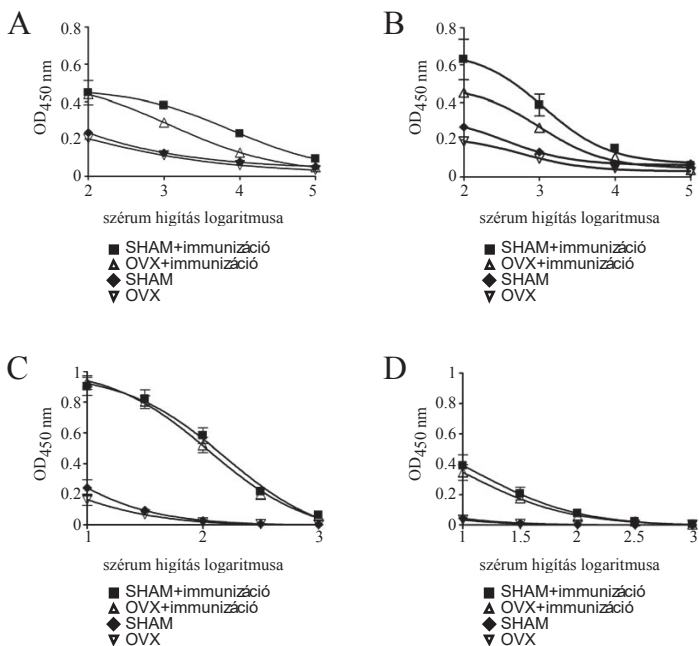
Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy sikerült olyan egyláncú ellenanyag konstrukciót létrehoznunk, amely reményeink szerint mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérleti rendszerekben alkalmas lesz a GL7 építőp funkciójának tisztázására.

4.2 Az ösztrogén immunmoduláló hatása

4.2.1. Ovariektómia hatása a T-dependens és a T-independens-2 immunválaszra

Irodalmi adatok alapján a nemi hormonoknak igen összetett hatása lehet az immunválaszra. Ezt a hatást a hormonok különféle sejttípusokon fejthetik ki. Az ösztrogén B-sejtekre kifejtett hatását *in vitro* rendszerekben tanulmányozták. Többek között kimutatták, hogy az ösztrogén kezelés a naív repertoárt képviselő autoreaktív B-sejt klónok túléléséhez és aktivációjához vezet (Grimaldi, Cleary et al. 2002). Az ösztrogén immunválaszra kifejtett hatására vonatkozóan eddig még nincsenek adatok.

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az ösztrogén befolyásolja-e a T-dependens, illetve T-independens immunválaszt. Ezért ovariektómiát (OVX), illetve ál-műtétet (SHAM) követően az egereket TD (FITC-KLH), vagy TI-2 (dextrán-FITC) antigénnel immunizáltuk, majd a 6. napon vizsgáltuk a szérummintákban a FITC-specifikus ellenanyag titerét, illetve a lépből a FITC-specifikus IgM- és IgG-termelő sejtek számát. A FITC-specifikus IgM és IgG izotípusú ellenanyag titerét ELISA módszer segítségével határoztuk meg. Haptén-specifikus ellenanyag termelést mind az OVX, mind az ál-műtött egerekben kimutattunk. Azonban T-dependens antigénnel történő immunizálás után az ovariektomizált állatok FITC-specifikus IgM és IgG titere szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az intakt (ál-műtött) egereké (22. A,B ábra). Ezzel ellentétben, a TI-2-antigénnel immunizált állatok esetében nem találtunk különbséget az ovárium-irtott és ál-műtött egerek között, mind a FITC-specifikus IgM, mind az IgG termelés hasonló mértékűnek mutatkozott (22. C,D ábra).



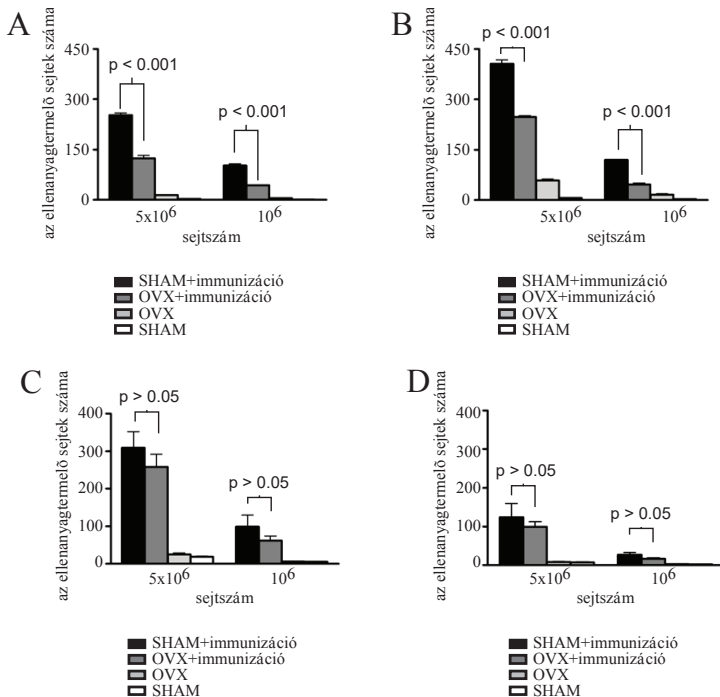
22. ábra. Ovariectómia hatása egér lépsejtek IgM és IgG termelésére TD, illetve TI antigénnel történő immunizálást követően.

A grafikonok IgM (A, C) és IgG (B, D) izotípusú ellenanyagok szintjét mutatják 6 nappal a TD (A, B), illetve TI-2 (C, D) antigénnel immunizált, illetve nem immunizált ovarióm-irtott (OVX), valamint álműtött (SHAM) egerek esetében. Az ábrázolt optikai denzitás (OD) értékek az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek poolozott szérummintáiból mért három párhuzamos átlagát és a standard hibát mutatják (\pm SD) (n=6/csoport).

További vizsgálódásunk arra irányult, hogy kiderítsük, vajon a csökkent szérum Ig-szint az ellenanyagtermelő sejtek számbeli csökkenésével áll-e kapcsolatban. Ezért OVX és SHAM állatok lépéből kinyert hapténspecifikus ellenanyagtermelő sejtek arányát vizsgáltuk ELISPOT módszer segítségével.

Az OVX állatok haptén-specifikus IgM- és IgG-termelő plazmasejtjeinek száma TD-antigénnel történő immunizálást követően szignifikánsan ($p < 0.001$) alacsonyabb volt, mint a kontroll, álműtött egerekben (23. A,B ábra). A kísérletek második részében, ahol az OVX

egereket TI-2 típusú antigénnel (dextran-FITC) immunizáltuk, ilyen eltérést nem tapasztaltunk a két állatcsoport között (23. C,D ábra). Ez azt sugallja, hogy az ovárium által termelt nemi hormonok fokozzák a T-sejtektől függő immunválaszt, míg a T-sejtektől független ellenanyagtermelésre nincsenek hatással.

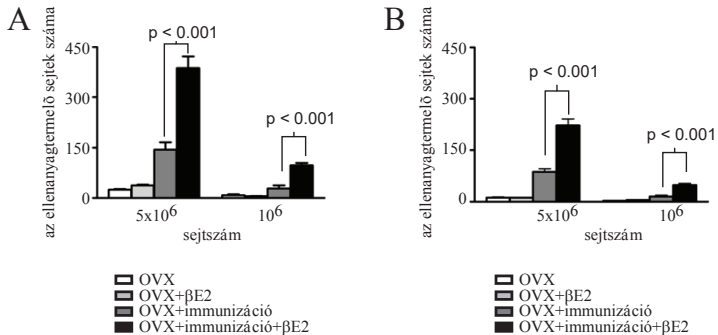


23. ábra. Haptén-specifikus IgG és IgM termelő sejtek vizsgálata OVX és SHAM egerekben TD és TI-2 immunizálást követően.

A diagramok IgM (A, C) és IgG (B, D) izotípusú ellenanyagot termelő lépsejtek számát mutatják 6 nappal a TD (A, B), illetve TI-2 (C, D) antigénnel immunizált, illetve nem immunizált ovárium-irtott (OVX), valamint ál-műtött (SHAM) egerek esetében. Az Y tengelyen ábrázolt értékek az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek lépsejteiből mért három párhuzamos átlagát és a standard hibát mutatják (\pm SD) (n=6/csoport).

4.2.2. Ösztrogén visszapótlás hatása az ovariectomizált egerek ellenanyagtermelésére

Kísérletet terveztünk annak tisztázására, hogy ovariectómia következtében kialakult ösztrogén hiány áll-e a csökkent TD immunválasz hátterében. Az ovariectómián átesett egereket immunizálás előtt, az operációt követő 2., 7., 12. és 17. napon 1 µg 17β-ösztradiollal kezeltük, majd az immunizálást követően ELISPOT módszerrel vizsgáltuk a haptén-specifikus ellenanyagtermelő sejtek számát. Eredményeink azt mutatják, hogy a TD antigénnel történt immunizálás következtében, az ösztrogén visszapótlása szignifikánsan ($p < 0.05$) emelte a FITC-specifikus IgM- és IgG-termelő lépsejtek számát a kezeletlen, ovariectómián átesett állatok értékeihez képest (24. ábra), ami arra utal, hogy a T-dependens immunválasz fokozó hatásért az ösztrogén tehető felelőssé.

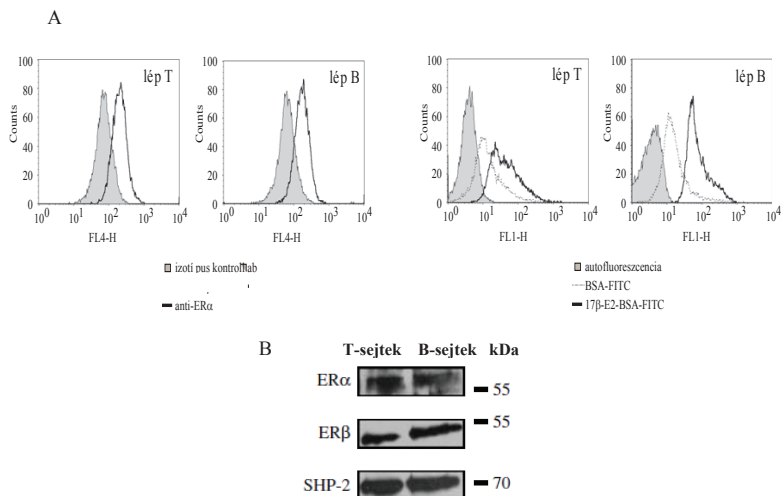


24. ábra. FITC-specifikus, IgM- és IgG izotípusú ellenanyagot termelő lépsejtek számának vizsgálata ösztrogén hatására.

A diagramok IgM (A) és IgG (B)-termelő lépsejtek számát (\pm SD) mutatják 6 nappal TD-antigénnel immunizált, illetve immunizálatlan, valamint 17β-ösztradiollal (βE2) kezelt, és kezeletlen ovárium-írtott (OVX) egerekben. Az eredmények az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek lépsejteiből mért három párhuzamos átlagát és a standard hibát mutatják (\pm SD) (n=6/csoport).

4.2.3. Az ösztrogén gyors, nem-genomiális hatásai B- és T-sejtekben: Akt és ERK foszforiláció

Az ösztrogén nem-klasszikus mechanizmuson keresztül kinázaskad aktivációt indukál, ezáltal szerepet játszik a T-sejt dependens B-sejt válaszban. E hormon hatása a limfociták humorális immunválasza során intracelluláris (magi) és membránkötött receptorokon keresztül valósulhat meg. Az ösztrogén gyors, nem-genomiális hatását mind citoplazmatikus, mind membrán receptorokon keresztül számos sejttípusban leírták (Moggs and Orphanides 2001; Simoncini, Fornari et al. 2002). Korábban munkacsoportunk áramlási citometria és konfokális mikroszkópia segítségével kimutatta B- (A20) és T-sejt (IP12-7), valamint egér primer B- és T-limfocitákon az ER-ok klasszikus intracelluláris és membrán kötött formáját is (25. A ábra). Az ER-okat western blot módszerrel is ki tudtuk mutatni (25. B ábra).

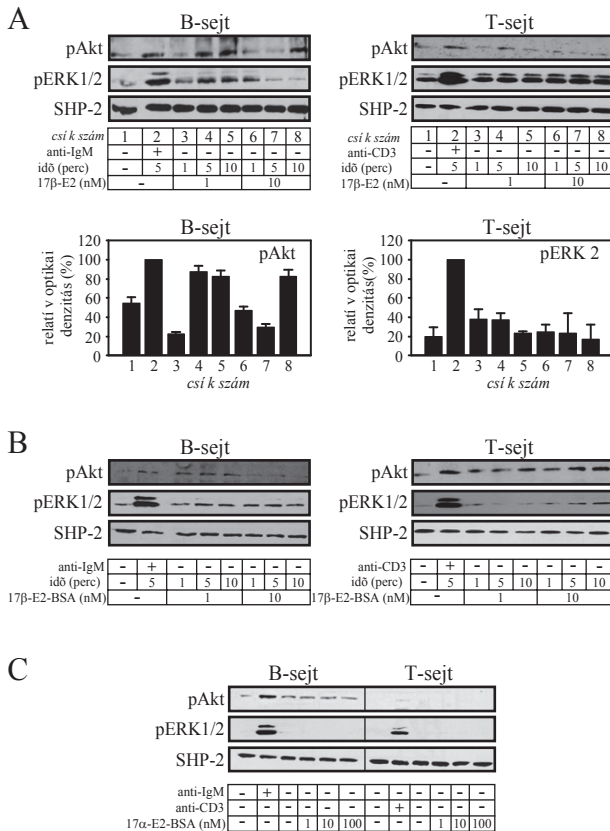


25. ábra. Klasszikus és membrán ösztrogén receptorok expressziója egér B- és T-sejtekben.

Munkacsoportunk az egér primer B-, és T-limfociták klasszikus (ERα, ERβ) és membrán ösztrogén receptor expresszióját áramlási citometria (A) valamint western blot módszer (B) segítségével mutatta ki. Kontrollként az SHP-2 fehérje szolgált.

Továbbá, munkacsoportunk *in vitro* rendszerben, szeparált egér B- és T-sejtekben vizsgálta különböző dózisú és idejű β E2 kezelés hatását az ERK és Akt kinázok foszforilációjára (26. ábra). Az eredmények szerint B-sejtekben az 1 nM koncentrációban alkalmazott β E2 idő-függő ERK1/2 és Akt foszforilációt indukált, míg magasabb koncentrációnak (≥ 10 nM) kevésbé volt hatása. T-sejtekben, ezzel ellentétben a β E2 csak kismértékű Akt és ERK aktivációt eredményezett. Továbbá, B-sejtekben nem volt különbség anti-IgM-mel, illetve ösztrogénnel és anti-IgM-mel együttesen történő stimuláció esetén (nem bemutatott eredmény). A membrán ösztrogénreceptor Akt- és ERK-foszforilációban játszott szerepének tisztázására a sejtek E2-BSA stimulust kaptak. Míg T-sejtekben a magasabb β E2-BSA koncentráció (≥ 10 nM) fokozta az ERK és Akt foszforilációt, addig B-sejtekben csak kismértékű változást lehetett megfigyelni. A β E2-BSA-val ellentétben, az α E2-BSA, habár azonos mértékben kötődik a limfocitákhoz, nem indukált ERK, illetve Akt foszforilációt.

Az eredmények azt mutatják, hogy az ösztrogén B-sejtekben elsősorban az intracelluláris ER α /ER β receptorokon keresztül, míg T-sejtekben inkább a membrán ösztrogén receptorokon keresztül fejti ki hatását.



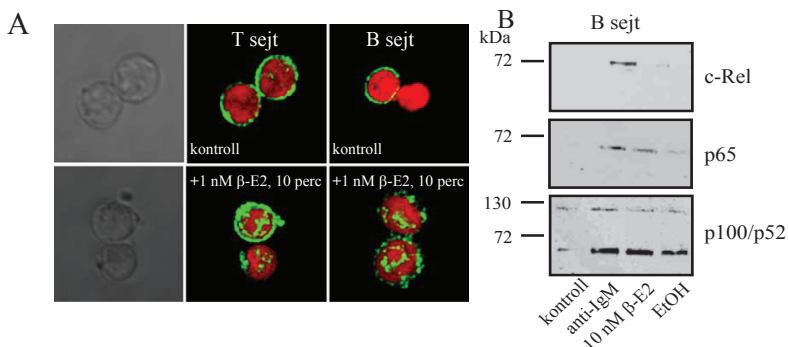
26. ábra. Az ösztrogén hatása az ERK és Akt kinázok foszforilációjára B- és T-limfocitákban (Adori, Kiss et al.).

Szeperált egér B- és T-sejtek a jelzett ideig, különböző dózísú βE2 (A), βE2-BSA (B), valamint αE2-BSA (C) kezelést kaptak, melyet a sejtlizátumokban található ERK és Akt kinázok foszforilációjának western blot analizise követett. Pozitív kontrollként a B-sejtek anti-IgM, a T-sejtek anti-CD3 stimulust kaptak. A western blot csíkok relatív optikai denzitásának grafikus ábrázolása és statisztikai értékelése során az egyes csíkok relatív denzitás értékei a totál SHP-2 mennyiségre lettek normalizálva.

4.2.4. Az ösztrogén NFκB aktivációt indukál B- és T-limfocitákban

Számos szignál útvonal közös célmolekulája egy kulcsfontosságú transzkripciós faktor, az NFκB. Sejtes jelátviteli folyamatok indukálják az NFκB aktivációját, majd transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba, ahol mint transzkripciós regulátor fejti ki hatását. Korábbi irodalmi adatok szerint az ösztrogén egér lépsejtekben és humán T-sejtekben különböző módon szabályozza az NFκB fehérjét (Hirano, Furutama et al. 2007; Stice and Knowlton 2008).

Munkánk során szeparált egér B- és T-limfocitákon konfokális mikroszkópia segítségével megvizsgáltuk, hogy vajon az *in vitro* ösztrogén kezelés modulálja-e az NFκB sejten belüli elhelyezkedését. Eredményeink azt mutatják, hogy az ösztrogén mind B-, mind T-sejtekben szignifikáns, részleges p65 NFκB magi transzlokációt okozott (27. A ábra). A βE2-kezelt B-sejtek magfrakciójából western blot analízissel vizsgáltuk különböző NFκB fehérjék (c-Rel, RelA/p65 and p100/52) jelenlétét. A 27. B ábra mutatja, hogy míg a cRel protein csak anti-IgM hatására aktiválódik, addig a p65 és p52 magi transzlokációja E2 hatására is végbemegy. Ez az eredmény megerősítette mikroszkópos vizsgálatainkat, és arra utal, hogy az ösztrogén aktiválja a p65 és p100/52 fehérjéket, ami géntranszkripciós folyamatokat indíthat el.

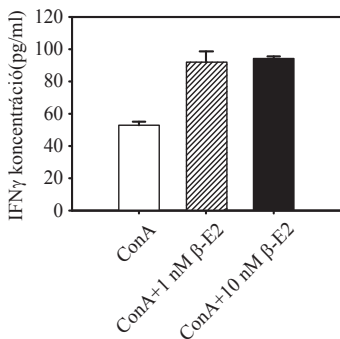


27. ábra. Az ösztrogén NFκB aktivációt és / magi transzlokációt indukál egér lép B- és T-sejtekben.

A reprezentatív DIC és fluoreszcens képek a 17β-ösztradiol-kezelt, illetve a kontroll egér lép T- és B-sejteket mutatják, ahol az NFκB p65 (zöld), mag (piros) (A). A cRel, RelA (p65), és a p100/p52 NFκB fehérjék magi transzlokációját egér lép B-sejtek esetében western blottal vizsgáltuk (B).

4.2.5. Az ösztrogén IFN γ gén aktivációt indukál B- és T-limfocitákban

Korábbi *in vivo* tanulmányokban leírták, hogy a 17 β -ösztradiollal kezelt egerek ConA-stimulált lépsejtjében az IFN γ és IL-2 mRNS expresszió megnövekedett, valamint e sejtek összehasonlítva a kezeletlen egerek lépsejtjeivel nagy mennyiségű IFN γ -t termelnek (Karpuzoglu-Sahin, Zhi-Jun et al. 2001). Annak tisztázása érdekében, hogy vajon *in vitro* ösztrogén kezelés során is indukálódik-e az IFN γ , C57Bl/6 egér lépsejteket tenyésztettünk ConA és/vagy β E2 jelenlétében, majd a felülúszó IFN γ tartalmát ELISA segítségével határoztuk meg. A β E2 növelte a sejtek IFN γ termelését, összehasonlítva a ConA kezelt sejtekkel, de önmagában hatástalan volt (28. ábra).



28. ábra. Az ösztrogén IFN γ génaktivációt/átírást indukál egér lép T-sejtekben.

C57Bl/6 nőtény egerek szeparálatlan lépsejtjeit *in vitro* aktiváltuk 15 μ g/ml ConA-val \pm 1 nM, illetve 10 nM 17 β -ösztradiollal, majd 72 óra elteltével a felülúszók IFN γ tartalmát ELISA módszerrel vizsgáltuk. Az oszlop diagramok 3 független mérés átlagából számolt IFN γ koncentrációt \pm SD-t mutatják.

DISZKUSSZIÓ

Az emlős sejteket borító glikokalixot alkotó glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok glikánláncainak bioszintézisében több, mint 60 glikánmódosító enzim (glikoziltranszferázok és glikozidázok) vesz részt. Ezek expressziója szövetenként eltérő, valamint az ontogenezis és/vagy az aktiváció során is változik. A glikoproteinek, glikolipidek glikánláncainak tipikus monoszacharid egységei a szíalsavak (Marth and Grewal 2008).

Ismert, hogy a lektinek közé tartozó, szíalsavtartalmú szénhidrát motívumokat szelektíven kötő, évről-évre bővülő sziglek család tagjai fontos szerepet játszanak számos immunológiai folyamat szabályozásában (Varki and Angata 2006). A legtöbb eger, illetve humán immunsejt expresszál egy, vagy több szigleket, amelyek mindegyike egyedi szialilált ligand-specifitással rendelkezik. Legtöbbjük intracelluláris részén jelátvitelben szerepet játszó ITIM, ITIM-szerű, illetve ITAM-tartalmú motívumok találhatók. Ezek alapján feltételezhetően különböző, részben átfedő szabályozó, illetve adhézis szerepet tölthetnek be (Crocker, Paulson et al. 2007). Tudott, hogy a CD22, mely egy α 2,6-szialilált glikánkötő sziglek, a B-sejt aktiváció szabályozásában játszik fontos szerepet, bár e folyamat mechanizmusa még nem teljesen ismert (Walker and Smith 2008). A GL7 patkány monoklonális IgM is α 2,6-szialilált glikánt ismer fel, de a CD22-vel ellentétben, amely a Neu5Gc szíalsavat köti, a GL7 Neu5Ac-specifikus (Naito, Takematsu et al. 2007). Nemrég kimutatták, hogy aktiválódott B-sejtekben (GC B-sejtek) a GL7 és a CD22 építóp expressziója között negatív korreláció áll fenn (Naito, Takematsu et al. 2007). Ez az aktivált limfocitákban a Neu5Ac-t Neu5Gc-vé alkító/konvertáló, CMAH enzim inaktivációjának tulajdonítható.

Az evolúció során a *Cmah* génben történt mutáció az enzim inaktiválódását okozta, ezáltal emberben a Neu5Gc nem található meg (Chou, Takematsu et al. 1998). E mutáció eredményeként, a rágcsálókkal ellentétben, a humán sejtek konstitutívan és kizárólagosan csak Neu5Ac-t expresszálnak. Ez a változás maga után vonta az emberi sziglekek egy részének, így pl. a CD22-nek a specifitás váltását, aminek következtében az emberi CD22 egyaránt kötődik a Neu5Gc és Neu5Ac szíalsavakhoz, ugyanakkor a megfelelő affinitással való kapcsolódás a szíalsav oldallánc molekuláris környezetétől is függ. Ennek következtében a CD22 sziglek specifitása emberben sem azonos a GL7 ellenanyagával (Kimura, Ohmori et al. 2007). Naito és munkatársai a *Cmah* génben történt mutáció következtében a GL7 építóp gyakorlatilag minden emberi szövetben ill. sejten történő

konstitutív megjelenését feltételezték (Naito, Takematsu et al. 2007). Ezzel szemben saját vizsgálataink a GL7 differenciált expresszióját igazolták. Izolált immunsejtek közül csak a limfocitákon tudtuk kimutatni, melyeken bár folyamatosan jelen van, sejtfelszíni mennyisége aktiváció hatására jól mérhetően változik, T-sejteken nő, míg B-sejteken csökken. Hasonlóan differenciált expressziót igazoltak munkacsoportunk emberi mandulából készített szöveti metszeteken végzett hisztokémiai vizsgálatai. Az egérben leírtakkal szemben (Han, Zheng et al. 1996; Han, Dillon et al. 1997) emberben a GL7 expresszió a csíráközpontokban nem korrelál a PNA festéssel (Balogh, Adori et al. 2009), a GL7 ellenanyag a follikulusok szélén lévő $CD19^{+}IgD^{+}IgM^{med}$ -sejteket festi a legerősebben.

A sziaľsavak glikánláncokhoz történő kapcsolását szialiltranszferáz enzimek (pl. ST6Gal) katalizálják. Minthogy a *Cmah* gén emberben inaktív, és ST6Gal enzim expresszió a GL7 monocitákban és DC-kben is kimutatható (Chou, Takematsu et al. 1998; Videira, Amado et al. 2008), feltételezhető, hogy a GL7 epitóp expressziójának szabályozásában e két enzimen kívül további, eddig még nem ismert enzimek is résztvesznek.

Továbbra is kérdés a GL7 epitópot tartalmazó molekula természete. Naito és munkatársai Raji és Daudi sejtekkel végzett membránlizist követő western blot alapján több különböző molekulásúlyú membrán glikoprotein GL7 ellenanyaggal való jelölődését mutatták ki (Naito, Takematsu et al. 2007). LPS-sel aktivált egér lép B-blasztokon korábban immunprecipitációt követő ^{35}S -metionin beépülés kimutatásával egy 35 kDa molekulásúlyú membrán glikoproteint sikerült detektálni (Laszlo, Hathcock et al. 1993). Ezt a korai eredményt később 2PK-3 egér B-sejtvonalon, más kísérleti rendszerben reprodukáltuk ugyan, azonban az eredmény mindezidáig nem bizonyult megbízhatóan, konzekvens módon mások által is megismételhetőnek. Ennek oka véleményünk szerint az epitóp kémiai természete mellett a GL7-et felismerő ellenanyag tulajdonságaiban és a még nem tökéletesen kidolgozott kísérleti rendszerben keresendő. Más megközelítésből nyert adataink azt mutatják, hogy az ellenanyag egér és humán sejteken is egy teljes mértékben neuraminidáz- és részben papainszenzitív epitópot ismer fel, így elképzelhető az is, hogy a GL7 szénhidrát epitóp sejttípustól függően kapcsolódhat egy, vagy több glikoproteinhez, vagy glikolipidhez is.

Az epitóp kémiai szerkezete, az a tény, hogy ezt felismerő molekulák jelen vannak a szervezetben (sziglekek) továbbá a mind egérben mind emberben tapasztalt sejttípustól, érési stádiumtól és aktivációtól függő differenciált megjelenése valószínűvé teszi, hogy

valamilyen funkcionális szerepe lehet a limfociták érése ill. aktivációja során. Munkacsoportunk egér és humán T- és B-sejtek membránjában is jelentős mértékben a raftokhoz asszociáltnak találta a GL7 epitópot (Balogh, Adori et al. 2009), ami szintén az aktivációban betöltött szerepére utalhat. Az a tény, hogy noha patkányban létrehozott klónról van szó, aktiváció hatására patkány limfocitákon is megjelenik az epitóp azt is sugallhatja, hogy ilyen specifitású IgM-ek az immunválasz szabályozásában feltételezett ún. természetes ellenanyag készlet részei lehetnek.

Az GL7-et felismerő ellenanyag egy monoklonális patkány IgM. A termeltetés és a tisztítás mikéntjétől függően, más IgM-ekhez hasonlóan maga is többé-kevésbé α 2,6-szialoglín (nem bemutatott adatok) és bár megfelelő affinitással rendelkezik, továbbá sose mutatott aspecifikus keresztreakciókat, könnyen elveszti a kötőképességét, aggregálódik. Nagy mérete, keresztalkötő képessége, Fc-függő funkciói számos módszerben, így pl. az epitóp funkcionális szerepének vizsgálatára tervezett kísérleteink többségében megnehezítik vagy teljesen kizárják alkalmazhatóságát. Reményeink szerint a munkánk során sikeresen létrehozott egyláncú ellenanyag segítségével ezen módszertani problémák többsége kiküszöbölhetővé válik és számos további kérdésre is választ tudunk majd adni.

Jól ismert, hogy a nemi hormonok mellett hogy, meghatározzák a nemi különbségeket, szabályozzák a reprodukciót, az immunválaszt moduláló hatással is rendelkeznek. Ez megnyílvánul egyes immunfolyamatok nemi különbségeiben is. Így pl. a nőkben magasabb immunglobulinszintet, hatékonyabb immunválaszt lehet tapasztalni, mint férfiakban. Továbbá, a nők hajlamosabbak egyes autoimmun betegségekre. Ezen különbségek hátterében álló molekuláris/sejtes mechanizmusok azonban még nem teljesen ismertek. Az ösztrogén immunválaszra kifejtett hatását egér modellekben vizsgálják. Egészséges egereken végzett tanulmányok szerint az ösztrogénkezelés poliklonális B-sejt aktiválódást és fokozott autoantitest termelést eredményez (Grimaldi, Michael et al. 2001). Számos mechanizmus előidézheti a saját struktúrákkal szemben kialakult tolerancia megszűnését és a plazmasejtek aktivitásának növekedését. Továbbá, a nemi hormonok hatással lehetnek a citokin környezetre: a hormonszint változása a citokin profilban eltolódást okozhat, s ezáltal szabályozhatja az immunválaszt (Straub 2007).

A szisztémás autoimmunbetegségek nőkben előforduló nagyobb gyakoriságával szemben (Whitacre 2001), a bakteriális fertőzések okozta halandóság és a nemi identitás között nem mutattak ki összefüggést (Crabtree, Pelletier et al. 1999). A B-sejtes immunválaszt az antigén természete alapján TD és TI csoportokba oszthatjuk. A TD antigének fehérjék, melyeket az antigénprezentáló sejtek feldolgoznak és MHC II

molekuláikon a Th-sejteknek prezentálnak. A TI-antigének TI-1 és TI-2 csoportba sorolhatók. A TI-1-es antigének mitogének, melyek poliklonális B-sejt aktivációt indukálnak. Az utóbbi csoportba poliszacharid-antigének tartoznak (pl. baktérium sejtfal), ezek a B-sejt receptor keresztkötésével indukálnak antigén-specifikus B-sejt választ (Obukhanych and Nussenzweig 2006).

Az ösztrogén TI immunválaszt befolyásoló hatását mindeddig még nem tanulmányozták ezért mi célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk e hormon hatását a TD és a TI-2 immunválaszra. Vizsgálatainkban ugyanannak a hapténnek (FITC) különböző – KLH-hoz (TD) vagy poliszaharidhoz (dextrán) (TI-2) konjugált – formáit használtuk. Eredményeink szerint az ovariectomizált egerekben csökkent az ellenanyagtermelő lépsejtek száma, ami kevesebb mennyiségű FITC-specifikus ellenanyag termelésében nyilvánult meg a KLH-FITC immunizált állatokban. Ugyanakkor, a TI-2 antigénre adott válasz során nem találtunk különbséget. Ez az új eredmény azt jelzi, hogy a női nemi hormonok T-sejtektől függő úton fejtik ki hatásukat a humorális immunválaszra. Eredményünk összhangban áll azzal a korábbi immunpatológiai megfigyeléssel, miszerint a TI-2 antigénre adott immunválasz nem mutat nemi különbségeket, míg a TD antigénre adott immunválaszt a női nemi hormonok erősen befolyásolják.

Ovariectomizált egerek fiziológias mennyiségű ösztrogén visszapótlása során kapott eredményeink tovább erősítik azt a feltételezésünket, hogy az ösztrogén szelektíven befolyásolja a TD immunválaszt. Az ösztrogénkezelés ugyanis szignifikánsan (2.5-szörösére) növelte a TD antigénre adott ellenanyagválaszt, a kontroll, kezeletlen egerekhez képest. Ez azt jelzi, hogy az ösztrogén az ellenanyagtermelő sejtek számának emelésével fokozza a T-sejt függő ellenanyag termelést.

Korábbi vizsgálatok szerint az ösztrogén-függő B-sejt válasz fokozódása a T-sejtek által termelt negatívan szabályozó citokinek gátlásán keresztül valósul meg (Straub 2007). Másrészt, azt is kimutatták hogy az ösztrogén modulálja a B-sejtek túlélését szabályozó molekulák expresszióját, közvetlenül stimulálja a CD22-t, az SHP-1-et és a Bcl-2-t, valamint az ösztrogénkezelés védi az izolált primer sejteket a B-sejt receptor mediált apoptózistól (Grimaldi, Cleary et al. 2002). Grimaldi és társai feltételezik, hogy az ösztrogén hatására megnövekedett Bcl-2 expresszió segíti az autoreaktív B-sejt klónok túlélését, míg az emelkedett CD22 és SHP-1 szint a B-sejtek deléciójához szükséges BCR-mediált jel küszöbét emeli meg. Tehát ösztrogén hatására a naív B-sejtek autoreaktív sejtekké válhatnak.

Az ösztrogén receptorok által aktivált jelpályákat B-sejtekben eddig nem vizsgálták. Munkánk során az ösztrogén B- és T-sejtekben indukált jelátvitelét analizáltuk. Az ösztrogén gyors, nem-genomiális hatását membrán és intracelluláris receptorokon keresztül egyaránt kifejti. Korábbi megfigyelésekkel összhangban (Benten, Stephan et al. 2002), munkacsoportunk C57Bl/6 egerek B- és T-sejtjein kimutatta mind az ER α , mind az ER β expressziót, továbbá, mindkét sejttípus membrán ER-okra is pozitív volt. Azonban a membrán kötött ER a B-sejtekben, ellentétben a T-sejtekkel, inaktívnak mutatkozott, minthogy E2-BSA konjugátum összehasonlítva az ösztrogénnel, mely intracelluláris receptoron keresztül fejti ki hatását, a B-sejtekben nem indukált sem intracelluláris Ca²⁺-növekedést, sem szignifikáns ERK, és Akt foszforilációt.

Az ösztrogén számos biológiai hatása nem-klasszikus úton érvényesül. Így pl. különböző sejtekben, tumorsejtekben, idegsejtekben kimutatták, hogy az ösztrogén intracelluláris szabályozó molekulákat stimulál, mint az ERK/MAPK, vagy a PI3K (Barabas, Szego et al. 2006; Thomas, Coen et al. 2006; Titolo, Mayer et al. 2008). Az ER jelátvitelének nem-genomiális mechanizmusát humán, valamint egér endothélium sejteken is leírták. Az ER fizikailag és funkcionálisan is kapcsolódik a PI3K-hoz, mely kölcsönhatás a PI3K kaskád, majd a Ser/Thr kinase Akt aktivációjához vezet. Ez utóbbi számos PI3K-dependens intracelluláris hatást irányít, mint pl. az endotheliális NO szintáz (eNOS) foszforilációját, aktivációját (Simoncini, Fornari et al. 2002). Limfocitákban azonban az ösztrogén indukálta jelátviteli folyamatokat részleteiben még nem vizsgálták. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint C57Bl/6 egerek lép B- és T-sejtjeiben *in vitro* ösztrogén kezelés idő-függő ERK1/2 és Akt foszforilációt indukált, míg a membrán ösztrogén receptorokhoz kötődő E2-BSA csak T-sejtekben idézett elő kinázaktivációt. Az Akt számos molekulát foszforilál, mint pl. a glikogén szintáz kináz-3- β (GSK-3 β), vagy a Bcl-2-associated death protein (Bad), így a mitokondriális citokróm-c felszabadulás és a kaspáz aktivitás gátlása révén megóvjaa a sejteket a programozott sejthaláltól. (Plas, Rathmell et al. 2002). Eredményeink tehát azt sugallják, hogy az ösztrogén közvetlenül hat a B- és a T-sejtekre, s emellett, hogy az aktivációs küszöböt csökkenti, Akt-médiált túlélő szignálokat indukál.

Nemrég kimutatták, hogy az ösztrogén modulálja az NF κ B aktivitást (Cutolo, Sulli et al. 2004). A korai ösztrogén hatás eredményeképpen a nem-genomiális úton, gyorsan aktiválódó NF κ B protektív szerepű, míg a későbbi ösztrogén válasz genomiális mechanizmusok révén NF κ B gátlást indukál (Stice and Knowlton 2008). Deshpande és

társai korábban leírták, hogy az ösztrogénkezelés egér MF-okban csökkentette az LPS-indukált citokintermelést és az NFκB aktivációt (Deshpande, Khalili et al. 1997). Munkánk során C57Bl/6 egerekből izolált B- és T-sejtekben is kimutattuk, hogy ösztrogén kezelés indukálta a p65 és p52 fehérjék gyors aktivációját és magi transzlokációját, míg a cRel fehérjére nem volt hatása. Az NFκB, mint transzkripció faktor kettős szereppel bír. Aktivációja során expresszálódnak mind pro-, mind anti-apoptotikus fehérjék, valamint pro- és anti-inflammatorikus citokinek (Stice and Knowlton 2008). A gyors NFκB aktiváció sejt proliferációhoz, túléléshez vezet, míg elnyújtott NFκB aktiváció krónikus gyulladás okozója lehet. Az ösztrogén különböző koaktivátorokat toborozhat az ER-NFκB komplexhez, ezáltal növelheti az NFκB aktivitást (Cerillo, Rees et al. 1998; Hirano, Furutama et al. 2007). Ez anti-apoptotikus fehérjék expressziójához vezethet, melyek az Akt-mediált túlélő jelekkel együttműködve megmenthetik a B-sejteket a BCR-általi programozott sejthaláltól.

Az *in vivo* TD immunválasz során E2 hatására tapasztalt megnövekedett ellenanyagszint felveti a kérdést, hogy vajon az ösztrogén indukál-e citokin expressziót, mely e hatásért felelős lehet. Korábbi *in vivo* eredményekkel összhangban kimutattuk *in vitro* rendszerben, hogy ConA stimulált lépsejtek ösztrogén hatására IFNγ-t termelnek. Ez az eredmény az ösztrogén NFκB aktivációt serkentő hatásával együtt azt sugallja, hogy az ösztrogén a TD antigén-specifikus B-sejtválaszt NFκB és IFNγ gén transzkripciójának stimulálása során indukálja.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az ösztrogén közvetlenül hat a B- és a T-sejtekre azokban gyors, nem-genomiális hatásokat indukálva, mind intracelluláris ER-on (B-sejt), mind membrán ER-on (főleg T-sejt) keresztül. Ezen hatások B- és T-sejtekben is p65 NFκB aktivációhoz vezetnek, ezáltal növelve a B-sejt túlélés esélyét. Ezen hatások együttesen a T- és B-sejtek között egy mélyebb kollaborációt eredményezhetnek a TD immunválasz során. Ezzel összhangban, *in vivo* eredményeink elsőként demonstrálják, hogy az ösztrogén valóban pozitívan modulálja a T-sejt dependens, de nem a T-sejt independens immunválaszt.

A limfociták aktiválódása és differenciálódása együtt jár a sejtfelszíni glikoproteinek, glikolipidek glikánláncainak glikoziltranszferázok (pl szialiltranszferáz, fukoziltranszferáz) és glikozidázok (pl. szialidázok/neuraminidázok) által történő átrendeződésével, a glikoziláció változásával. Számos kutatási eredmény igazolja, hogy a különböző glikoproteinek képződésében szerepet játszó, glikoziltranszferáz (elsősorban fukozil- és

szialiltranszferázok) és glikoziláz enzimek többsége szteroid hormonok kontrollja alatt áll. (Medvedova and Farkas 2004). Anic és Mesaric patkány vese sejtekben kimutatta, hogy míg a nemi hormonok közé tartozó tesztoszteron a 2,3- és a 2,6-szialiltranszferázok aktivitását, addig az ösztrogén és a progeszteron csak a 2,6-szialiltranszferázok aktivitását csökkentette (Anic and Mesaric 1998). Humán MCF-7 tüdőrák sejtekben az ösztrogén a ST6Gal III enzim expresszióját szignifikánsan növelte, míg a ST6Gal I szialiltranszferáz enzimét csökkentette. A hormon dózis-függő és tamoxifennel teljesen antagonistá hatást mutatott (Peyrat, Recchi et al. 2000).

Saját, nagyban előzetes, tájékoztató jellegű kísérleteink adatai azt mutatják, hogy az ösztrogén befolyásolja az egér B-limfociták sejtfelszíni glikozilációját. Wang és munkatársai kimutatták az ösztrogén és a chlordecone aktiváló hatását a lép GC B-sejtekre, amit a CXCR4, CXCR5, GL7 molekulák expressziójának növekedésével jellemeztek (Wang, Roberts et al. 2007). Mivel azt is kimutatták hogy az ösztrogén modulálja a B-sejtek túlélését szabályozó molekulák expresszióját és közvetlenül stimulálja a CD22 expresszió emelkedését (Grimaldi, Cleary et al. 2002), felgyorsítja a betegség megjelenését és növeli a mortalitást az autoimmun MLR/lpr egerekben ahol a lépsejtek 10-20 %-át kitevő B220⁺Thy1⁺CD4⁺CD8⁻ sejtpopulációt GL7⁺-nak találtuk (László Glória nem közölt adatok), érdekessé válik annak vizsgálata is, hogy ösztrogén hatásra hogyan változik a CD22 ligandum hozzáférhetősége és ezzel összefüggésben a GL7 epitóp jelenlétének mértéke.

FONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK

- Megállapítottuk, hogy a GL7 patkány monoklonális ellenanyag egy teljesen szialidáz-, és részben papain-szenzitív epitópot ismert fel egér és humán limfocitákon is. Különböző egér és humán eredetű sejteket vizsgálva az epitóp jelenléte pozitív korrelációt mutatott az $\alpha 2$ -6- kötő SNA és negatív korrelációt az $\alpha 2$ -3- szialsavakat kötő MAA II lektin kötődésével míg a galaktozil- β 1-3-N-acetilgalaktózamin felismerő PNA esetében semmilyen összefüggés nem volt kimutatható.
- Kimutattuk, hogy a GL7 epitóp patkány limfocitákon is az egerekben leírt aktiváció függő módon jelenik meg. Kifejeződése emberben is a limfocitákra korlátozódik és bár ezeken konstitutív módon jelen van, sejtfelszíni expressziójának mértéke aktiváció hatására differenciáltan változik.
- Sikeresen állítottunk elő egyláncú ellenanyagot a GL7 monoklonális patkány IgM-et termelő hibridklónból.
- Kimutattuk *in vivo* kísérletekben, hogy az ösztrogén növeli a C57Bl/6 egér B-sejtek TD-antigénre adott immunválaszát, míg a Tl-2 immunválaszt nem befolyásolja.
- Megállapítottuk, hogy a megnövekedett T-dependens immunválasz a haptén-specifikus ellenanyagot termelő plazmasejtek számának növekedésének tulajdonítható.
- Kimutattuk, hogy az E2 visszapótlás szignifikánsan növeli a TD antigénre adott ellenanyagválaszt, a kontroll, kezeletlen egerekhez képest, ami azt jelzi, hogy az ösztrogén az ellenanyagtermelő sejtek számának emelésével fokozza a T-sejt függő ellenanyagtermelést.
- Kimutattuk, hogy az ösztrogén kezelés indukálta a p65 és p52 NF κ B fehérjék gyors aktivációját és magi transzlokációját, míg a cRel fehérjére aktivációját nem befolyásolta.
- Korábbi *in vivo* eredményekkel összhangban kimutattuk *in vitro* rendszerben, hogy ConA stimulált lépsejtek ösztrogén hatására IFN γ -t termelnek. Ez az eredmény az ösztrogén NF κ B aktivációt serkentő hatásával együtt azt sugallja, hogy az ösztrogén a TD antigén-specifikus B-sejtválaszt részben az NF κ B és IFN γ gén transzkripciójának stimulálása révén indukálja.

ÖSSZEFOGLALÁS

A limfociták aktiválódása és differenciálódása együtt jár a sejtfelszíni glikoproteinek, glikolipidek glikánláncainak glikoziltranszferázok és glikozidázok által történő átrendeződésével, a glikoziláció változásával. A glikoziláció szerepe az immunsejtek migrációjában régóta ismert, és egyre több tanulmány bizonyítja fontosságát a patogénfelismerésben, a természetes immunrendszer működésének modulálásában, a gyulladás folyamatok és az immunsejtek homeosztázisának szabályozásában is. Számos adat szól a különböző szialsav tartalmú cukrokat specifikusan felismerő sziglekek szabályozó szerepéről. A nemrégben a Neu5Ac szialsavként azonosított GL7 epitóp egérben a B- és T-limfociták érési és aktiváltsági állapotától függő differenciált megjelenési mintázatot mutat, jelen van a B-sejt érés korai stádiumaiban, egyes timocita populációkon, majd a másodlagos nyirokszervekben az aktivált limfocitákat jellemzi, a germinális centrum B-blasztok markere. Az epitópot hordozó sejtfelszíni molekulát mindeztáig nem sikerült azonosítani. Munkánk során megállapítottuk, hogy a GL7 patkány monoklonális ellenanyag egy teljesen szialidáz-, és részben papain-szenzitív epitópot ismer fel, melynek aktiváció függő, differenciált megjelenését kimutattuk patkány és humán limfocitákon is. Az epitópot felismerő ellenanyag IgM izotípusából adódó módszertani nehézségek kiküszöbölésére sikeresen állítottunk elő egyláncú ellenanyagot.

Jól ismert, hogy a nemi hormonok, így az ösztrogének is befolyásolják a limfociták differenciációját, érését, migrációját, résztvesznek a glikoziláció folyamatának szabályozásában, ezáltal fontos szerepet töltenek be a megfelelő immunválasz kialakításában. Továbbá szerepük van egyes autoimmun betegségek kialakulásában, a szabályozó hatás háttere azonban egyelőre kevésbé ismert. Munkánk során egyrészt *in vivo* rendszerben vizsgáltuk az ösztrogén TD és a TI B-sejt válaszra kifejtett hatását és megállapítottuk, hogy C57Bl/6 egerek TI ellenanyag választ az ösztrogén nem befolyásolja, viszont az ellenanyagtermelő sejtek számának emelésével jelentősen fokozza a TD választ. Kimutattuk továbbá hogy, az ösztrogén kezelés indukálja a p65 és p52 NFκB transzkripciós faktorok gyors aktivációját és magi transzlokációját. Korábbi *in vivo* eredményekkel összhangban *in vitro* rendszerben is kimutattuk, hogy ConA stimulált lépsejtek ösztrogén hatására IFN γ -t termelnek, mely eredmény az ösztrogén NFκB aktivációt serkentő hatásával együtt azt sugallja, hogy az ösztrogén a TD antigén-specifikus B-sejtválaszt NFκB és IFN γ gén transzkripciójának stimulálása során indukálja.

SUMMARY

Glycosylation is an enzymatic process producing a diverse repertoire of glycans linked to proteins, lipids or other saccharides. An increasing number of studies show the importance of glycosylation in pathogen recognition, in controlling homeostasis and inflammation or in the maturation and activation of adaptive immune cells. Siglecs are a family of sialic acid binding proteins that are known to influence various functions of mammalian immune cells. The expression of the GL7 epitope, recently shown as a Neu5Ac sialic acid, has been revealed to depend on the activation and differentiation state of T and B lymphocytes in mice; it is present on early and immature bone marrow B cells, on certain thymocyte populations and on activated T and B cells in secondary lymphoid organs. GL7 is a well known marker of germinal center B blasts. The nature of the GL7 epitope bearing molecules is still unclear. The presented data clearly demonstrate that the epitope is fully neuraminidase- and partially papain-sensitive. Our results reveal that, however, the expression profile of GL7 is different in human and rodents the constitutively expressed GL7 epitope in human is also lymphocyte-restricted and shows an activation dependent bi-directional regulation. A single chain Ab construction was successfully produced in order to overcome the technical difficulties caused by the IgM isotype of GL7 recognizing mAb.

It is well known that estrogen influences the differentiation, maturation, and emigration of lymphocytes, which are all essential for an adequate immune response. Moreover, preferential susceptibility of females to autoimmune diseases in both humans and other mammals also suggests a critical role of estrogen in regulation of immune responses. The molecular background of the effect of estrogen on the immune system still remained largely unexplored. As an as yet less studied area of this question, here we compared the effect of estrogen on TD and TI-2 response. The response to TI-2 antigen did not change, but we further confirmed that estrogen selectively elevated the antibody response to TD antigen in C57Bl/6 mice, through enhancing the number of antibody-forming cells. Rapid activation and nuclear translocation of transcription factors p65 and p52 NF κ B could also be detected upon estrogen stimuli of mouse lymphocytes. In agreement with previous *in vivo* data, *in vitro* β E2 treatment enhances IFN γ synthesis of ConA stimulated spleen cells. Together with the data showing the β E2 triggered NF κ B activation, these results indicate that β E2 may enhance B cell response to TD antigen *via* inducing NF κ B activation and IFN γ gene transcription.

IRODALOMJEGYZÉK

- Acconcia, F., P. Ascenzi, et al. (2005). "Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol." Mol Biol Cell **16**(1): 231-7.
- Acconcia, F., P. Ascenzi, et al. (2004). "S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions." Biochem Biophys Res Commun **316**(3): 878-83.
- Adori, M., E. Kiss, et al. "Estrogen augments the T cell-dependent but not the T-independent immune response." Cell Mol Life Sci.
- Ahmed, R. and D. Gray (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." Science **272**(5258): 54-60.
- Allen, C. D., T. Okada, et al. (2007). "Imaging of germinal center selection events during affinity maturation." Science **315**(5811): 528-31.
- Allera, A. and L. Wildt (1992). "Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles--II. Comparative influx and efflux." J Steroid Biochem Mol Biol **42**(7): 757-71.
- Angata, T., R. Hingorani, et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel mouse Siglec, mSiglec-F: differential evolution of the mouse and human (CD33) Siglec-3-related gene clusters." J Biol Chem **276**(48): 45128-36.
- Angata, T., S. C. Kerr, et al. (2002). "Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia." J Biol Chem **277**(27): 24466-74.
- Angata, T., Y. Tabuchi, et al. (2007). "Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution." Glycobiology **17**(8): 838-46.
- Angata, T. and A. Varki (2000). "Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways." J Biol Chem **275**(29): 22127-35.
- Angata, T. and A. Varki (2000). "Siglec-7: a sialic acid-binding lectin of the immunoglobulin superfamily." Glycobiology **10**(4): 431-8.
- Anic, M. and M. Mesaric (1998). "The influence of sex steroid hormones on ganglioside biosynthesis in rat kidney." Biol Chem **379**(6): 693-7.
- Ansel, K. M., V. N. Ngo, et al. (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature **406**(6793): 309-14.
- Armitage, R. J. and M. R. Alderson (1995). "B-cell stimulation." Curr Opin Immunol **7**(2): 243-7.
- Avril, T., S. D. Freeman, et al. (2005). "Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation." J Biol Chem **280**(20): 19843-51.
- Balasenthil, S., C. J. Barnes, et al. (2004). "Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells." FEBS Lett **567**(2-3): 243-7.
- Balogh, A., M. Adori, et al. (2009). "A closer look into the GL7 antigen: Its spatio-temporally selective differential expression and localization in lymphoid cells and organs in human." Immunol Lett doi:10.1016/j.imlet.2009.12.008.
- Barabas, K., E. M. Szego, et al. (2006). "Sex differences in oestrogen-induced p44/42 MAPK phosphorylation in the mouse brain in vivo." J Neuroendocrinol **18**(8): 621-8.

- Barna, M., T. Komatsu, et al. (1996). "Sex differences in susceptibility to viral infection of the central nervous system." J Neuroimmunol **67**(1): 31-9.
- Beato, M. and J. Klug (2000). "Steroid hormone receptors: an update." Hum Reprod Update **6**(3): 225-36.
- Bebo, B. F., Jr., J. C. Schuster, et al. (1999). "Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells." J Immunol **162**(1): 35-40.
- Benten, W. P., C. Stephan, et al. (2002). "B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol." Steroids **67**(7): 647-54.
- Boonyaratanakornkit, V. and D. P. Edwards (2004). "Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones." Essays Biochem **40**: 105-20.
- Bunone, G., P. A. Briand, et al. (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." Embo J **15**(9): 2174-83.
- Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-6.
- Bynoe, M. S., C. M. Grimaldi, et al. (2000). "Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2703-8.
- Callard, R. E., R. J. Armitage, et al. (1993). "CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome." Immunol Today **14**(11): 559-64.
- Carmeci, C., D. A. Thompson, et al. (1997). "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer." Genomics **45**(3): 607-17.
- Carter, R. H. and R. Myers (2008). "Germinal center structure and function: lessons from CD19." Semin Immunol **20**(1): 43-8.
- Cerillo, G., A. Rees, et al. (1998). "The oestrogen receptor regulates NFkappaB and AP-1 activity in a cell-specific manner." J Steroid Biochem Mol Biol **67**(2): 79-88.
- Cervenak, L., A. Magyar, et al. (2001). "Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells." Immunol Lett **78**(2): 89-96.
- Chambers, C. A. and J. P. Allison (1997). "Co-stimulation in T cell responses." Curr Opin Immunol **9**(3): 396-404.
- Chambliss, K. L., I. S. Yuhanna, et al. (2002). "ERbeta has nongenomic action in caveolae." Mol Endocrinol **16**(5): 938-46.
- Chen, J. Q., M. Delannoy, et al. (2004). "Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E1011-22.
- Choe, J., H. S. Kim, et al. (1997). "The functional role of B cell antigen receptor stimulation and IL-4 in the generation of human memory B cells from germinal center B cells." J Immunol **159**(8): 3757-66.
- Chou, H. H., H. Takematsu, et al. (1998). "A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11751-6.
- Christie, D. R., F. M. Shaikh, et al. (2008). "ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function." J Ovarian Res **1**(1): 3.
- Comelli, E. M., M. Sutton-Smith, et al. (2006). "Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans." J Immunol **177**(4): 2431-40.
- Confavreux, C., M. Hutchinson, et al. (1998). "Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group." N Engl J Med **339**(5): 285-91.

- Cornish, A. L., S. Freeman, et al. (1998). "Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33." Blood **92**(6): 2123-32.
- Correale, J., M. Arias, et al. (1998). "Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects." J Immunol **161**(7): 3365-74.
- Crabtree, T. D., S. J. Pelletier, et al. (1999). "Gender-dependent differences in outcome after the treatment of infection in hospitalized patients." Jama **282**(22): 2143-8.
- Crocker, P. R. (2005). "Siglecs in innate immunity." Curr Opin Pharmacol **5**(4): 431-7.
- Crocker, P. R., E. A. Clark, et al. (1998). "Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins." Glycobiology **8**(2): v.
- Crocker, P. R., S. Mucklow, et al. (1994). "Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains." Embo J **13**(19): 4490-503.
- Crocker, P. R., J. C. Paulson, et al. (2007). "Siglecs and their roles in the immune system." Nat Rev Immunol **7**(4): 255-66.
- Crocker, P. R. and A. Varki (2001). "Siglecs, sialic acids and innate immunity." Trends Immunol **22**(6): 337-42.
- Cutolo, M., B. Seriole, et al. (2002). "Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis." Ann N Y Acad Sci **966**: 131-42.
- Cutolo, M., A. Sulli, et al. (2004). "Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity." Lupus **13**(9): 635-8.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-102.
- Csomor, E., Z. Bajtay, et al. (2007). "Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells." Mol Immunol **44**(13): 3389-97.
- de Vinuesa, C. G., M. C. Cook, et al. (2000). "Germinal centers without T cells." J Exp Med **191**(3): 485-94.
- Deckert-Schluter, M., C. Buck, et al. (1999). "Kinetics and differential expression of heat-stable antigen and GL7 in the normal and Toxoplasma gondii-infected murine brain." Acta Neuropathol **98**(1): 97-106.
- DeFranco, D. B. and P. Csermely (2000). "Steroid receptor and molecular chaperone encounters in the nucleus." Sci STKE **2000**(42): pe1.
- Deshpande, R., H. Khalili, et al. (1997). "Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages." Am J Reprod Immunol **38**(1): 46-54.
- Dressel, U., D. Thormeyer, et al. (1999). "Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily." Mol Cell Biol **19**(5): 3383-94.
- Ebnet, K. and D. Vestweber (1999). "Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines." Histochem Cell Biol **112**(1): 1-23.
- Erben, R. G., S. Raith, et al. (1998). "Ovariectomy augments B lymphopoiesis and generation of monocyte-macrophage precursors in rat bone marrow." Am J Physiol **274**(3 Pt 1): E476-83.
- Evans, A. C., Jr. and T. G. Muldoon (1991). "Characterization of estrogen-binding sites associated with the endoplasmic reticulum of rat uterus." Steroids **56**(2): 59-65.
- Evinger, A. J., 3rd and E. R. Levin (2005). "Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function." Steroids **70**(5-7): 361-3.
- Falkenstein, E., H. C. Tillmann, et al. (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-56.

- Fazilleau, N., L. Mark, et al. (2009). "Follicular helper T cells: lineage and location." Immunity **30**(3): 324-35.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science **272**(5258): 50-3.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." Mol Endocrinol **14**(10): 1649-60.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2002). "Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis." Mol Endocrinol **16**(1): 70-84.
- Floyd, H., J. Ni, et al. (2000). "Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily." J Biol Chem **275**(2): 861-6.
- Forster, R., T. Emrich, et al. (1994). "Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells." Blood **84**(3): 830-40.
- Forster, R., A. E. Mattis, et al. (1996). "A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen." Cell **87**(6): 1037-47.
- Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.
- Fox, E. M., J. Andrade, et al. (2009). "Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways." Steroids **74**(7): 622-7.
- Freeman, S. D., S. Kelm, et al. (1995). "Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules." Blood **85**(8): 2005-12.
- Garside, P., E. Ingulli, et al. (1998). "Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node." Science **281**(5373): 96-9.
- Grimaldi, C. M., J. Cleary, et al. (2002). "Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation." J Clin Invest **109**(12): 1625-33.
- Grimaldi, C. M., D. J. Michael, et al. (2001). "Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus." J Immunol **167**(4): 1886-90.
- Gunn, M. D., K. Tangemann, et al. (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 258-63.
- Han, S., S. R. Dillon, et al. (1997). "V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes." Science **278**(5336): 301-5.
- Han, S., K. Hathcock, et al. (1995). "Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers." J Immunol **155**(2): 556-67.
- Han, S., B. Zheng, et al. (1996). "Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells." Science **274**(5295): 2094-7.
- Han, X., P. Lundberg, et al. (2001). "Gender influences herpes simplex virus type 1 infection in normal and gamma interferon-mutant mice." J Virol **75**(6): 3048-52.
- Hardy, R. R., P. W. Kincade, et al. (2007). "The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage." Immunity **26**(6): 703-14.
- Hartnell, A., J. Steel, et al. (2001). "Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations." Blood **97**(1): 288-96.

- Hathcock, K. S., G. Laszlo, et al. (1994). "Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function." J Exp Med **180**(2): 631-40.
- Hathcock, K. S., C. E. Pucillo, et al. (1995). "Analysis of thymic subpopulations expressing the activation antigen GL7. Expression, genetics, and function." J Immunol **155**(10): 4575-81.
- Hauser, A. E., T. Junt, et al. (2007). "Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns." Immunity **26**(5): 655-67.
- Hennet, T., D. Chui, et al. (1998). "Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4504-9.
- Hirano, S., D. Furutama, et al. (2007). "Physiologically high concentrations of 17beta-estradiol enhance NF-kappaB activity in human T cells." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(4): R1465-71.
- Hisamoto, K., M. Ohmichi, et al. (2001). "Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells." J Biol Chem **276**(5): 3459-67.
- Ikehara, Y., S. K. Ikehara, et al. (2004). "Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9." J Biol Chem **279**(41): 43117-25.
- Irie, A., S. Koyama, et al. (1998). "The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans." J Biol Chem **273**(25): 15866-71.
- Jacob, J., R. Kassir, et al. (1991). "In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations." J Exp Med **173**(5): 1165-75.
- Jensen, E. V. and E. R. DeSombre (1973). "Estrogen-receptor interaction." Science **182**(108): 126-34.
- Jeurissen, A., J. L. Ceuppens, et al. (2004). "T lymphocyte dependence of the antibody response to T lymphocyte independent type 2' antigens." Immunology **111**(1): 1-7.
- Kamei, Y., L. Xu, et al. (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." Cell **85**(3): 403-14.
- Karpuzoglu-Sahin, E., Y. Zhi-Jun, et al. (2001). "Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice." Cytokine **14**(4): 208-17.
- Kelm, S., A. Pelz, et al. (1994). "Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." Curr Biol **4**(11): 965-72.
- Kelsoe, G. (1996). "Life and death in germinal centers (redux)." Immunity **4**(2): 107-11.
- Kimura, N., K. Ohmori, et al. (2007). "Human B-lymphocytes express alpha2-6-sialylated 6-sulfo-N-acetylactosamine serving as a preferred ligand for CD22/Siglec-2." J Biol Chem **282**(44): 32200-7.
- Komi, J. and O. Lassila (2000). "Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells." Blood **95**(9): 2875-82.
- Kosco-Vilbois, M. H., H. Zentgraf, et al. (1997). "To 'B' or not to 'B' a germinal center?" Immunol Today **18**(5): 225-30.
- Kramer, P. R. and S. Wray (2002). "17-Beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis." J Steroid Biochem Mol Biol **81**(3): 203-16.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.
- Kurucz, I., J. A. Titus, et al. (1995). "Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies." Mol Immunol **32**(17-18): 1443-52.

- Laszlo, G., K. S. Hathcock, et al. (1993). "Characterization of a novel cell-surface molecule expressed on subpopulations of activated T and B cells." J Immunol **150**(12): 5252-62.
- Li, L., M. P. Haynes, et al. (2003). "Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4807-12.
- Lindhout, E., G. Koopman, et al. (1997). "Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions." Immunol Today **18**(12): 573-7.
- Losel, R. M., E. Falkenstein, et al. (2003). "Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers." Physiol Rev **83**(3): 965-1016.
- MacLennan, I. C., Y. J. Liu, et al. (1992). "Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses." Immunol Rev **126**: 143-61.
- Maggiolini, M., A. Vivacqua, et al. (2004). "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells." J Biol Chem **279**(26): 27008-16.
- Marth, J. D. and P. K. Grewal (2008). "Mammalian glycosylation in immunity." Nat Rev Immunol **8**(11): 874-87.
- McHeyzer-Williams, M. G. and R. Ahmed (1999). "B cell memory and the long-lived plasma cell." Curr Opin Immunol **11**(2): 172-9.
- McMillan, S. J. and P. R. Crocker (2008). "CD33-related sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in health and disease." Carbohydr Res **343**(12): 2050-6.
- Medina, K. L., G. Smithson, et al. (1993). "Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy." J Exp Med **178**(5): 1507-15.
- Medvedova, L. and R. Farkas (2004). "Hormonal control of protein glycosylation: role of steroids and related lipophilic ligands." Endocr Regul **38**(2): 65-79.
- Miller, C. and G. Kelsoe (1995). "Ig VH hypermutation is absent in the germinal centers of aged mice." J Immunol **155**(7): 3377-84.
- Miller, C., G. Kelsoe, et al. (1994). "Lack of B7-2 expression in the germinal centers of aged mice." Aging Immunol Inf Dis **5**(3-4): 249-257.
- Moggs, J. G. and G. Orphanides (2001). "Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses." EMBO Rep **2**(9): 775-81.
- Mond, J. J., A. Lees, et al. (1995). "T cell-independent antigens type 2." Annu Rev Immunol **13**: 655-92.
- Moriarty, K., K. H. Kim, et al. (2006). "Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling." Endocrinology **147**(12): 5557-63.
- Mosselman, S., J. Polman, et al. (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Lett **392**(1): 49-53.
- Munday, J., S. Kerr, et al. (2001). "Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor." Biochem J **355**(Pt 2): 489-97.
- Murasawa, M., S. Okada, et al. (2002). "GL7 defines the cycling stage of pre-B cells in murine bone marrow." Eur J Immunol **32**(1): 291-8.
- Naito, Y., H. Takematsu, et al. (2007). "Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation." Mol Cell Biol **27**(8): 3008-22.
- Nath, D., P. A. van der Merwe, et al. (1995). "The amino-terminal immunoglobulin-like domain of sialoadhesin contains the sialic acid binding site. Comparison with CD22." J Biol Chem **270**(44): 26184-91.

- Nicoll, G., J. Ni, et al. (1999). "Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes." *J Biol Chem* **274**(48): 34089-95.
- Norfleet, A. M., M. L. Thomas, et al. (1999). "Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry." *Endocrinology* **140**(8): 3805-14.
- Norman, A. W., M. T. Mizwicki, et al. (2004). "Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model." *Nat Rev Drug Discov* **3**(1): 27-41.
- O'Connor, B. P., M. Cascalho, et al. (2002). "Short-lived and long-lived bone marrow plasma cells are derived from a novel precursor population." *J Exp Med* **195**(6): 737-45.
- O'Dowd, B. F., T. Nguyen, et al. (1998). "Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes." *Genomics* **47**(2): 310-3.
- Obukhanych, T. V. and M. C. Nussenzweig (2006). "T-independent type II immune responses generate memory B cells." *J Exp Med* **203**(2): 305-10.
- Olsen, N. J. and W. J. Kovacs (2002). "Hormones, pregnancy, and rheumatoid arthritis." *J Gend Specif Med* **5**(4): 28-37.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* **270**(5240): 1354-7.
- Oosterwegel, M. A., R. J. Greenwald, et al. (1999). "CTLA-4 and T cell activation." *Curr Opin Immunol* **11**(3): 294-300.
- Otero, D. C., A. N. Anzelon, et al. (2003). "CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals." *J Immunol* **170**(1): 73-83.
- Owman, C., P. Blay, et al. (1996). "Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **228**(2): 285-92.
- Paharkova-Vatchkova, V., R. Maldonado, et al. (2004). "Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors." *J Immunol* **172**(3): 1426-36.
- Pappas, T. C., B. Gametchu, et al. (1995). "Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding." *Faseb J* **9**(5): 404-10.
- Patel, N., E. C. Brinkman-Van der Linden, et al. (1999). "OB-BP1/Siglec-6, a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily." *J Biol Chem* **274**(32): 22729-38.
- Paul, S. P., L. S. Taylor, et al. (2000). "Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2." *Blood* **96**(2): 483-90.
- Paulson, J. C. and K. J. Colley (1989). "Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation." *J Biol Chem* **264**(30): 17615-8.
- Paulson, J. C., J. Weinstein, et al. (1989). "Tissue-specific expression of sialyltransferases." *J Biol Chem* **264**(19): 10931-4.
- Petri, M., D. Howard, et al. (1991). "Frequency of lupus flare in pregnancy. The Hopkins Lupus Pregnancy Center experience." *Arthritis Rheum* **34**(12): 1538-45.
- Pettersson, K., K. Grandien, et al. (1997). "Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha." *Mol Endocrinol* **11**(10): 1486-96.

- Peyrat, J. P., M. A. Recchi, et al. (2000). "Regulation of sialyltransferase expression by estradiol and 4-OH-tamoxifen in the human breast cancer cell MCF-7." Mol Cell Biol Res Commun **3**(1): 48-52.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1977). "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells." Nature **265**(5589): 69-72.
- Plas, D. R., J. C. Rathmell, et al. (2002). "Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications." Nat Immunol **3**(6): 515-21.
- Powell, L. D., D. Sgroi, et al. (1993). "Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition." J Biol Chem **268**(10): 7019-27.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (1997). "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocr Rev **18**(3): 306-60.
- Prossnitz, E. R., J. B. Arterburn, et al. (2007). "GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen." Mol Cell Endocrinol **265-266**: 138-42.
- Prossnitz, E. R., T. I. Oprea, et al. (2008). "The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **109**(3-5): 350-3.
- Randall, T. D., A. W. Heath, et al. (1998). "Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers." Immunity **8**(6): 733-42.
- Razandi, M., G. Alton, et al. (2003). "Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane." Mol Cell Biol **23**(5): 1633-46.
- Razandi, M., A. Pedram, et al. (1999). "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells." Mol Endocrinol **13**(2): 307-19.
- Rijkers, G. T. and D. E. Mosier (1985). "Pneumococcal polysaccharides induce antibody formation by human B lymphocytes in vitro." J Immunol **135**(1): 1-4.
- Rijkers, G. T., E. A. Sanders, et al. (1998). "Infant B cell responses to polysaccharide determinants." Vaccine **16**(14-15): 1396-400.
- Rolink, A. and F. Melchers (1993). "B lymphopoiesis in the mouse." Adv Immunol **53**: 123-56.
- Ruiz-Irastorza, G., F. Lima, et al. (1996). "Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: a prospective study of 78 pregnancies." Br J Rheumatol **35**(2): 133-8.
- Schauer, R. (2009). "Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions." Curr Opin Struct Biol **19**(5): 507-14.
- Schonbeck, U., F. Mach, et al. (2000). "CD154 (CD40 ligand)." Int J Biochem Cell Biol **32**(7): 687-93.
- Schwickert, T. A., R. L. Lindquist, et al. (2007). "In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure." Nature **446**(7131): 83-7.
- Sgroi, D., A. Varki, et al. (1993). "CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin." J Biol Chem **268**(10): 7011-8.
- Shirakawa, F. and S. B. Mizel (1989). "In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C." Mol Cell Biol **9**(6): 2424-30.
- Simoncini, T., L. Fornari, et al. (2002). "Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase." Steroids **67**(12): 935-9.
- Simoncini, T. and A. R. Genazzani (2003). "Non-genomic actions of sex steroid hormones." Eur J Endocrinol **148**(3): 281-92.

- Slifka, M. K., R. Antia, et al. (1998). "Humoral immunity due to long-lived plasma cells." Immunity **8**(3): 363-72.
- Smith, K. G., T. D. Hewitson, et al. (1996). "The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci." Eur J Immunol **26**(2): 444-8.
- Smithson, G., W. G. Beamer, et al. (1994). "Increased B lymphopoiesis in genetically sex steroid-deficient hypogonadal (hpg) mice." J Exp Med **180**(2): 717-20.
- Smithson, G., K. Medina, et al. (1995). "Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture." J Immunol **155**(7): 3409-17.
- Sobel, E. S., J. Gianini, et al. (2005). "Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides in (NZB x NZW)F1 mice." Environ Health Perspect **113**(3): 323-8.
- Sprent, J. (1997). "Immunological memory." Curr Opin Immunol **9**(3): 371-9.
- Stice, J. P. and A. A. Knowlton (2008). "Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response." Mol Med **14**(7-8): 517-27.
- Straub, R. H. (2007). "The complex role of estrogens in inflammation." Endocr Rev **28**(5): 521-74.
- Takada, Y., C. Kato, et al. (1997). "Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress." Biochem Biophys Res Commun **240**(3): 737-41.
- Takashima, S. (2008). "Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity." Biosci Biotechnol Biochem **72**(5): 1155-67.
- Tanriverdi, F., L. F. Silveira, et al. (2003). "The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity." J Endocrinol **176**(3): 293-304.
- Tarlinton, D. (1998). "Germinal centers: form and function." Curr Opin Immunol **10**(3): 245-51.
- Taylor, V. C., C. D. Buckley, et al. (1999). "The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2." J Biol Chem **274**(17): 11505-12.
- Thomas, W., N. Coen, et al. (2006). "Estrogen induces phospholipase A2 activation through ERK1/2 to mobilize intracellular calcium in MCF-7 cells." Steroids **71**(3): 256-65.
- Titolo, D., C. M. Mayer, et al. (2008). "Estrogen facilitates both phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK1/2 mitogen-activated protein kinase membrane signaling required for long-term neuropeptide Y transcriptional regulation in clonal, immortalized neurons." J Neurosci **28**(25): 6473-82.
- Toellner, K. M., W. E. Jenkinson, et al. (2002). "Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers." J Exp Med **195**(3): 383-9.
- Toran-Allerand, C. D., X. Guan, et al. (2002). "ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury." J Neurosci **22**(19): 8391-401.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- Varki, A. (1997). "Sialic acids as ligands in recognition phenomena." Faseb J **11**(4): 248-55.
- Varki, A. (2001). "Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution." Am J Phys Anthropol Suppl **33**: 54-69.
- Varki, A. (2009). "Multiple changes in sialic acid biology during human evolution." Glycoconj J **26**(3): 231-45.

- Varki, A. and T. Angata (2006). "Siglecs--the major subfamily of I-type lectins." Glycobiology **16**(1): 1R-27R.
- Varki, N. M. and A. Varki (2007). "Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease." Lab Invest **87**(9): 851-7.
- Verthelyi, D. and D. M. Klinman (2000). "Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo." Immunology **100**(3): 384-90.
- Videira, P. A., I. F. Amado, et al. (2008). "Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis." Glycoconj J **25**(3): 259-68.
- Virgo, P., P. A. Denning-Kendall, et al. (2003). "Identification of the CD33-related Siglec receptor, Siglec-5 (CD170), as a useful marker in both normal myelopoiesis and acute myeloid leukaemias." Br J Haematol **123**(3): 420-30.
- Walker, J. A. and K. G. Smith (2008). "CD22: an inhibitory enigma." Immunology **123**(3): 314-25.
- Walter, P., S. Green, et al. (1985). "Cloning of the human estrogen receptor cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7889-93.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, et al. (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." Immunity **1**(5): 405-13.
- Wang, F., S. M. Roberts, et al. (2007). "Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides: a comparison of splenic B-cell effects of chlordecone and estradiol in (NZBxNZW)F1 mice." Toxicol Sci **99**(1): 141-52.
- Wang, R. A., A. Mazumdar, et al. (2002). "P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium." Embo J **21**(20): 5437-47.
- Watson, C. S., R. A. Alyea, et al. (2007). "Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues." Mol Cell Endocrinol **274**(1-2): 1-7.
- Wen, L., W. Pao, et al. (1996). "Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells." J Exp Med **183**(5): 2271-82.
- Whitacre, C. C. (2001). "Sex differences in autoimmune disease." Nat Immunol **2**(9): 777-80.
- Whitney, G., S. Wang, et al. (2001). "A new siglec family member, siglec-10, is expressed in cells of the immune system and has signaling properties similar to CD33." Eur J Biochem **268**(23): 6083-96.
- Wilder, R. L. (1998). "Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases." Ann N Y Acad Sci **840**: 45-50.
- Wilson, G. L., C. H. Fox, et al. (1991). "cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions." J Exp Med **173**(1): 137-46.
- Yu, Z., C. M. Lai, et al. (2001). "Identification and characterization of S2V, a novel putative siglec that contains two V set Ig-like domains and recruits protein-tyrosine phosphatases SHPs." J Biol Chem **276**(26): 23816-24.
- Zhang, J., A. Raper, et al. (2006). "Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors." Blood **107**(9): 3600-8.
- Zhang, J. Q., G. Nicoll, et al. (2000). "Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes." J Biol Chem **275**(29): 22121-6.
- Zhang, M., T. Angata, et al. (2007). "Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils." Blood **109**(10): 4280-7.

Zhang, Y., N. Champagne, et al. (2004). "Estrogen and androgen protection of human neurons against intracellular amyloid beta1-42 toxicity through heat shock protein 70." J Neurosci **24**(23): 5315-21.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Erdei Annának, hogy az Immunológiai Tanszéken dolgozhattam, és jó hangulatú munkahelyet biztosított számomra. Külön köszönettel tartozom Dr. László Glória és Prof. Sármay Gabriella témavezetőimnek, valamint Dr. Matkó Jánosnak, akik segítsége és szakmai támogatása nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönettel tartozom Dr. Prechl Józsefnek, aki bevezetett a molekuláris biológia rejtelseibe és sokat segített a módszerek elsajátításában, valamint a munkám során fellépő problémák megoldásában. Külön köszönöm a munkacsoportunkban dolgozó kollégáimnak, barátaimnak, Balogh Andreának és Kiss Endrének a rengeteg szakmai segítséget és biztatást. Köszönöm Tímárné Veress Erzsébetnek (Böbinek), és Pásztor Mártának, hogy megteremtették a kísérletek technikai feltételeit, Mikesy Árpádnak (Papának) az állatkísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. Köszönöm barátaimnak és kollégáimnak, hogy mindig számíthattam rájuk: Judit, Andi, Zsuzsi, Krisz, Adri, Isi, Máté, Dorka, Indián, Noémi, Zsuzska, Helgus. Köszönet illeti a tanszék valamennyi dolgozóját, hogy megteremtették a tanszékre jellemző vidám légkört. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak, hogy rengeteg türelemmel és szeretettel segítettek és lehetővé tették számomra, hogy idáig eljuthassak.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent saját közlemények:

1. **A closer look into the GL7 antigen: Its spatio-temporally selective expression and localization in lymphoid cells and organs in human.**

Andrea Balogh, Mónika Ádori*, Katalin Török, János Matkó and Glória László*
Immunology Letters. Epub ahead: doi:10.1016/j.imlet.2009.12.008
Impact factor: 2,858

2. **Estrogen augments the T cell-dependent but not the T-independent immune response**

*Mónika Ádor*i, Endre Kiss*, Zsuzsanna Barad, Klaudia Barabás, Edda Kiszely, Andrea Schneider, Erna Sziksz, István M. Ábrahám, János Matkó and Gabriella Sármay*
Cellular and Molecular Life Sciences. Epub ahead: DOI 10.1007/s00018-010-0270-5
Impact factor: 5,51

(*megosztott elsőszervezők)

Folyóiratban megjelent konferencia absztraktok

Pozsgai M., Boja R. Prechl J. and László G.
Bacterially expressed scFv construct to search for GL7 function.
Immunology Letters 73: 163, 2000

Ádori M., Balogh A., Weiszhár Zs., Prechl J., Matkó J. and László G.
Studies on cell specific expression, structure and membrane localization of a late lymphoid activation antigen Ly77 (GL7)
The FEBS Journal 272 (supplement 1): 223, 2005

Kongresszusi kiadványban megjelent konferencia

Pozsgai M., Boja R., Prechl J., László G.:
A GL7 specifikus ellenanyag variábilis doménjeit tartalmazó scFv konstrukció előállítás.
MIT vándorgyűlés, Budapest, 2000

Weiszhár Z., Ádori M., Prechl J., László G.:
A GL7 (Ly77) specifikus ellenanyag egy szialidáz érzékeny epitópot ismer fel
MIT vándorgyűlés, Győr, 2003

Ádori M., Balogh A., Prechl J., László G.:
Structural and functional study on Ly77 (GL7) by an scFv construction
MIT vándorgyűlés, Szeged, 2004

Ádori M., Balogh A., Weiszhár Zs., Matkó J., László G.:
Expression, structure and membrane localization of Ly77 (GL7), a supposed adhesion molecule on lymphoid and myeloid cells
13th EFIS Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, 2005

Ádori M., Balogh A., Weiszhár Z., Prechl J., Matkó J., László G.:
Az egér limfoid sejteken leírt késői aktivációs antigén Ly77 (GL7) sejt-specifikus expressziójának, szerkezetének és membránlokalizációjának vizsgálata
MIT vándorgyűlés, Sopron, 2005

Ádori M., Barabás K., Barad Zs., Kövesdi D., Ábrahám I., Sármai G.:
Estrogen enhances antibody response to T cell dependent antigen by increasing the number of antibody producing cells
16th European Congress of Immunology, Paris, 2006

Barad Zs., Ádori M., Barabás K., Kövesdi D., Ábrahám I., Sármai G.:
Non-genomic effects of oestrogen on B-cells

14th EFIS Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, 2007

Barad Zs., Ádori M., Barabás K., Kövesdi D., Ábrahám I., Polgár B., Sármai G.:
Az ösztrogén szelektíven fokozza a B sejtek T-dependens antigénre adott válaszát és a B sejtek túléléséhez vezető aktivációs jeleket vált ki.
MIT Vándorgyűlés, Hajdúszoboszló, 2007

Kiss E., Ádori M., Barad Zs., Barabás K., Kiszely E., Schneider A., Kövesdi D., Ábrahám I., Sármai G., Matkó J.:
Estrogen regulates T-dependent humoral immune response and exerts rapid, non-genomic effects on B and T lymphocytes
15th EFIS Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, 2009

Balogh A., Ádori M., Matkó J., László G.:
Expression and signaling of GL7 in human lymphocytes
15th EFIS Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, 2009

Balogh A., Ádori M., Matkó J., László G.:
Comparative study of GL7 expression in mouse and human
2nd Congress of European Immunology Societies. Berlin, 2009